

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Glutamin bei herzchirurgischen Eingriffen –  
Effekte auf die polarisierte T-Zell-Zytokinexpression**

vorgelegt von Sebastian Ruhs  
aus Nürnberg  
Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie,  
Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Hempelmann

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: PD Dr. J.M. Engel

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Tag der Disputation: 24.10.2007

Für meine Eltern, Karl-Heinz und Ursula Ruhs

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	7
<b>1.1 Historische Entwicklung der parenteralen Aminosäuresubstitution</b>	7
<b>1.2 Glutamin und seine Bedeutung für den Menschen</b>	8
<b>1.3 Das Immunsystem</b>	11
1.3.1 <i>Die unspezifische Abwehr</i>	11
1.3.2 <i>Die spezifische Abwehr</i>	12
1.3.3 <i>Zytokine</i>	15
<b>1.4 Kardiochirurgie und das Immunsystem</b>	17
<b>1.5 Glutamin und das Immunsystem</b>	19
<b>1.6 Gibt es ein Patientenkollektiv, das besonders von Glutamin profitiert?</b>	19
<b>1.7 Fragestellung</b>	20
<b>2. Patienten und Methoden</b>	22
<b>2.1 Patienten</b>	22
<b>2.2 Studiendesign</b>	23
<b>2.3 Op-Ablauf</b>	26
<b>2.4 Prinzip: Vom Vollblut bis zur Messung</b>	27
<b>2.5 Laborprotokoll der Markierung intrazellulärer Zytokine</b>	29
2.5.1 <i>Vorbereitung der Reagenzien</i>	29
2.5.2 <i>Aktivierung des heparinisierten Vollblutes</i>	30
2.5.3 <i>Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Reinigung</i>	31
2.5.4 <i>Kontrollen zur optimalen Einstellung des Fluoreszenzdurchflusszytometers</i>	32
<b>2.6 Prinzip und Funktion des Durchflusszytometers</b>	33
<b>2.7 Prinzip der Auswertung</b>	36
2.7.1 <i>Prinzip der Bestimmung der T-Zellen</i>	36
2.7.2 <i>Isotypenkontrolle</i>	37
2.7.3 <i>Aktivierungskontrolle</i>	38
2.7.4 <i>Permeabilitätskontrolle</i>	39
2.7.5 <i>Die zu untersuchenden Proben</i>	39

<b>2.8</b>	<b>Computereinstellung und Messung der Proben</b>	39
2.8.1	<i>Allgemeine Computereinstellungen</i>	39
2.8.2	<i>Geräteeinstellung</i>	41
2.8.3	<i>Aktivierungskontrolle</i>	42
2.8.4	<i>Permeabilitätskontrolle</i>	43
2.8.5	<i>Messung der Proben</i>	43
<b>2.9</b>	<b>Analyse der gewonnenen Daten</b>	43
<b>2.10</b>	<b>Bestimmung von Glutamin mittels hochauflösender Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatografie (F-HPLC)</b>	46
2.10.1	<i>Automatisierte Vorsäulen-Derivatisierung</i>	46
2.10.2	<i>Gradientenelution</i>	46
2.10.3	<i>Qualitätskontrolle bei der Bestimmung von plasmatischem Glutamin mittels F-HPLC</i>	47
<b>2.11</b>	<b>Statistik</b>	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	49
<b>3.1</b>	<b>Grunddaten</b>	49
3.1.1	<i>Patientencharakteristika nach Gruppen</i>	49
3.1.2	<i>Patientencharakteristika, getrennt nach den Untersuchungsorten</i>	50
<b>3.2</b>	<b>Operationscharakteristika</b>	51
<b>3.3</b>	<b>Klinische Parameter</b>	53
<b>3.4</b>	<b>Infektionsraten sowie klinisches „Outcome“</b>	54
<b>3.5</b>	<b>Leukozytenzahlen im zeitlichen Verlauf</b>	55
<b>3.6</b>	<b>Grafische Darstellung der Messergebnisse</b>	56
3.6.1	<i>Interleukin-2, Gesamt</i>	57
3.6.2	<i>Interleukin-2, Terzile 1</i>	58
3.6.3	<i>Interleukin-1</i>	59
3.6.4	<i>Interleukin-8, Gesamt</i>	60
3.6.5	<i>Interleukin-8, Terzile 1</i>	61
3.6.6	<i>Interleukin-10, Gesamt</i>	62
3.6.7	<i>Interleukin-10, Terzile 1</i>	63
3.6.8	<i>Plasma-Glutamin-Spiegel</i>	64

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	65
<b>4.1</b>	<b>Bestimmung intrazellulärer Zytokine mittels Durchflusszytometrie</b>	65
4.1.1	<i>Die Methodik</i>	65
4.1.2	<i>Die Stimulation</i>	66
<b>4.2</b>	<b>Die perioperative Polarisation der T-Lymphozyten</b>	67
<b>4.3</b>	<b>Die Bedeutung des Plasma-Glutamin-Spiegels und Detektion von intrazellulärem IL-2 bei stimulierten T-Lymphozyten</b>	70
<b>4.4</b>	<b>Detektion von intrazellulärem IL-1, IL-8 und IL-10 bei stimulierten T-Lymphozyten</b>	74
4.4.1	<i>Interleukin-1</i>	74
4.4.2	<i>Interleukin-8</i>	75
4.4.3	<i>Interleukin-10</i>	76
<b>4.5</b>	<b>Klinischer Verlauf und das Auftreten von Infektionen bei kardiochirurgischen Patienten unter Glutamin</b>	76
<b>4.6</b>	<b>Resümee</b>	83
<b>4.7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	86
<b>4.8</b>	<b>Summary</b>	88
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	91
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	99
<b>6.1</b>	<b>Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Detektion intrazellulärer Zytokine</b>	99
<b>6.2</b>	<b>Patientendaten</b>	105
<b>6.3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	107
<b>6.4</b>	<b>Verwendete Materialien</b>	109
<b>7.</b>	<b>Lebenslauf</b>	112
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	113

# **1. Einleitung**

## **1.1 Historische Entwicklung der parenteralen Aminosäuresubstitution**

Das Wissen, dass die Ernährung einen überlebenswichtigen Faktor für alle Lebewesen darstellt, ist den Menschen seit jeher bewusst. Entsprechend nahe liegt es, dass auch in vergangenen Zeiten darüber nachgedacht wurde, einen Zusammenhang zwischen Essen, Trinken und dem Verlauf einer Erkrankung herzustellen. Bis vor einigen Jahrzehnten war jedoch die Möglichkeit der Verabreichung von bestimmten Nährstoffen bei kritisch Kranken eingeschränkt und man wusste noch wenig über den eigentlichen Nährstoffbedarf des Menschen (53). Die systematische Erforschung dieses Gebietes begann Mitte des 19. Jahrhunderts mit der Entdeckung von naturwissenschaftlichen Grundlagen, die die Voraussetzung für das Erkennen von physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhängen waren und gleichzeitig erst deren klinisch-technische Umsetzung ermöglichten.

1827 teilte der englische Arzt William Proud die Nährstoffe in drei Gruppen ein: zuckrige, ölige und eiweißartige (53). In der zweiten Hälfte des gleichen Jahrhunderts wurde mit tierischen Proteinextrakten erstmals versucht, eine parenterale eiweißhaltige Ernährung an Kranken durchzuführen. Die verabreichten Lösungen erzeugten jedoch erhebliche Nebenwirkungen bei den Patienten, da diese Verbindungen langkettige Proteine und Polypeptide beinhalten. Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die Proteinbestandteile für ähnliche Untersuchungen hauptsächlich aus dem Säurehydrolysat des Kaseins oder aus Rindfleisch gewonnen. Diese Hydrolysate beinhalten freie Aminosäuren und Oligopeptide, die immer noch langkettig genug waren, um allergische Reaktionen auszulösen (98). Etwa zur gleichen Zeit gelang eine enzymatische Hydrolysierung von Proteinen und damit eine Zufuhr von reinen Aminosäuren. Somit war der Grundstein für genauere Untersuchungen bezüglich der speziellen Bedürfnisse an Proteinen für den Menschen gelegt (30). Das Wissen über das Spektrum der essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren wurde erweitert (78). 1940 wurde das erste Mal über die Verabreichung einer Lösung aus kristalloiden Aminosäuren berichtet (81). Diese haben den Vorteil gegenüber den enzymatisch hydrolysierten Proteinlösungen, dass die Zusammensetzung der Aminosäuren genau bestimmt werden kann. Nachdem es möglich wurde, die kristalloiden Aminosäuren in größeren Mengen günstig zu produzieren, wurde spezieller erforscht, inwiefern diese dem krankheitsspezifischen Bedarf angepasst werden können. Mitte der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts vertieften Fürst et al. die Forschung zu dieser Thematik und untersuchten die Veränderungen der Aminosäurekonzentrationen im menschlichen Körper in verschiedenen Stresssituationen. Die Ergebnisse

zeigten, dass freies Glutamin im Körper in katabolen Stoffwechselsituationen stark abfällt (93). Diese Entdeckung ist seitdem Inhalt zahlreicher Untersuchungen.

## **1.2 Glutamin und seine Bedeutung für den Menschen**

Glutamin ist die im menschlichen Körper in freier Form am häufigsten vorkommende Aminosäure und hat mit 600 – 700  $\mu\text{M}$  die höchste Plasmakonzentration von allen Aminosäuren (27, 83). Unter physiologischen Bedingungen kann es in ausreichendem Maße synthetisiert werden und wird deshalb als nicht-essentielle Aminosäure betrachtet. Glutamin hat zahlreiche Funktionen und dient unter anderem als Substrat zur Proteinsynthese und als Vorstufe für intrazelluläres Glutathion. Des weiteren ist es eine wichtige Energiequelle vor allem für stark proliferierende Zellen wie Enterozyten (12) und immunkompetente Zellen (6). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Glutamin isolierten Lymphozyten in großem Maße als Substrat für den Stoffwechsel dient (1). Als Vorstufe für die Purin- und Pyrimidinsynthese ist es auch an der Nukleinsäure- und Nukleotidsynthese beteiligt (70). Glutamin ist der wichtigste Transporter von Stickstoff beziehungsweise Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) aus den peripheren Organen zur Niere und hat deshalb eine entscheidende Funktion in der Ammoniakhomöostase. In der Niere wird von Glutamin  $\text{NH}_3$  abgespalten und in Form von  $\text{NH}_4^+$  ausgeschieden. Mit der Bindung dieses zusätzlichen Protons aus dem Blut wird auch gleichzeitig der Säure-Base-Haushalt des Körpers reguliert. Entsprechend ist während einer Azidose der Glutaminbedarf der Niere erhöht (15).

Glutathion ist ein wichtiges intrazelluläres Antioxidanz und essentiell zur Aufrechterhaltung der physiologischen Zellfunktion. Zur Synthese werden Glutamat, Cystein und Glycin benötigt (62). Glutamat gelangt als geladenes Molekül nur in geringer Menge direkt in die Zellen, da es im Gegensatz zu der neutralen Aminosäure Glutamin, Zellmembranen nur schwer durchdringen kann (104). Glutamat wird aus diesem Grund zu einem großen Teil aus Glutamin gewonnen, welches somit eine wichtige Vorstufe in der Glutathionsynthese darstellt. In Situationen wie Sepsis oder nach schwerem Trauma, in denen es zu einem Abfall von freiem Glutamin im Plasma kommt, sinkt in verschiedenen Geweben ebenfalls der messbare Glutathionspiegel ab (44, 75). Wird aber das Angebot an Glutamin in der Nahrung erhöht, konnte bei gesunden Ratten auch eine Erhöhung des Glutathionspiegel im Plasma nachgewiesen werden (17).

Des weiteren hat Glutamin eine wichtige Funktion als Stickstofftransporter von Orten der Glutaminsynthese, wie Skelettmuskel, Leber und Lunge, zu Geweben mit hohem Glutaminbedarf, wie Niere, Darm und Zellen des Immunsystems. Syntheseorgane, wie die



Skelettmuskulatur spielen gleichzeitig auch als Speicher für diese Aminosäure eine wichtige Rolle in der Glutaminhomöostase. Bei Bedarf kann in kurzer Zeit Glutamin in großer Menge in die Kreislaufzirkulation abgegeben werden und gelangt auf diesem Weg zu den Zellen der Bedarfsorgane, wie der Mukosa des Magen-Darm-Traktes, der Leber, der Niere und den immunkompetenten Zellen (82).

Extremer Stress in Verbindung mit kataboler Stoffwechselsituation, der beispielsweise bei Sepsis oder schweren chirurgischen Eingriffen auftritt, kann dazu führen, dass die Eigensynthese des Körpers den steigenden Bedarf an Glutamin nicht mehr deckt. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff eingeschränkt essentiell (conditionally essential) geprägt (52). In solch einer Situation haben vor allem die Zellen des Immunsystems, der Niere und der Darmmukosa einen erhöhten Bedarf an Glutamin. Verursacht durch die stark erhöhte Nachfrage, fällt die Glutaminkonzentration im Plasma und in der Muskulatur messbar ab. Der posttraumatische Proteinumsatz im Körper hängt maßgeblich von der Größe des Gewebeschadens ab. Kleinere Operationen, wie Herniotomie, verursachen nur eine mäßige oder gar keine Reaktion im Gesamtproteinstoffwechsel. Große Verletzungen hingegen, wie großflächige Verbrennungen, führen zu einer maximalen Stoffwechsel- und auch Immunreaktion (99).

In einer Hungerperiode, wie sie auch bei kritisch Kranken vorkommen kann, vor allem wenn diese fehl- oder mangelernährt werden, ist die Muskulatur als Hauptspeicher von Glutamin und Proteinen besonders von einem Masseverlust betroffen. Statistisch gesehen kann ein gesunder Erwachsener eine Hungerperiode von ungefähr 40 Tagen überstehen, bis er durch einen Nährstoffmangel in eine kritische Phase gelangt (27). In dieser Zeit verliert der Körper etwa 4kg an Proteinen, die hauptsächlich aus der Muskulatur stammen. Das entspricht einer Abnahme der Gesamtmuskelmasse, welche etwa zur Hälfte aus Eiweiß besteht, von rund 70 bis 80% (27). Geht man davon aus, dass Patienten über 60 Jahre bereits aus Altersgründen eine um 20% verminderte Muskelmasse haben, so reduziert sich deren voraussichtliche Überlebenszeit in einer Hungerperiode um 10 Tage auf nur noch 30 Tage (27). Damit stellt diese Patientengruppe allein schon aus nutritiver Sicht für den postoperativen Verlauf eine Risikogruppe dar.

Hammarqvist et al. (28) konnten nachweisen, dass die parenterale glutaminhaltige Ernährung dem Abfall des Glutaminspiegels und einer Verminderung der Proteinsynthese nach chirurgischen Eingriffen in der Muskulatur entgegenwirkt. Oudemans-van Straaten et al. (72) stellten in diesem Rahmen die These auf, dass es einen Zusammenhang zwischen niedrigem Plasmaglutaminspiegel und einer erhöhten Mortalität im Krankenhaus gibt.

Um den Einfluss von Glutamin auf den klinischen Verlauf, vor allem in Bezug auf die infektiöse Morbidität, genauer zu untersuchen, wurden mehrere Studien an verschiedenen Patientenkollektiven durchgeführt (35, 72, 100). Man kam zu dem Ergebnis, dass durch Glutamin entscheidende Parameter positiv beeinflusst werden. So konnte unter anderem eine deutliche Abnahme der Anzahl an Sepsis, Pneumonie und Bakteriämie verzeichnet werden (35, 100). Bei chirurgischen Patienten, die eine glutaminhaltige Ernährung erhielten, verkürzte sich die Dauer des Krankenhausaufenthaltes signifikant. Auch die Anzahl der Infektionen sank. Der größte Gewinn war bei den Patienten zu verzeichnen, die hochdosiert parenteral Glutamin erhielten (64, 71, 99).

Grundsätzlich gibt es zwei Wege, auf denen Glutamin dem Patienten verabreicht werden kann: Parenteral oder enteral. In den meisten Studien, die sich mit der Wirkung von Glutamin auf den kritischen Kranken befasst haben, erhielten die teilnehmenden Patienten Glutamin nur über einen der beiden Wege. Die Ergebnisse bezüglich der Unterschiede zwischen parenteraler und enteraler Zufuhr lassen sich in der Gegenüberstellung der verschiedenen Untersuchungen gut miteinander vergleichen.

Glutamin als Ergänzung zur enteralen Nutrition (EN) erzielte einen positiven Effekt, da die Infektionsraten mit gramnegativen Bakterien bei diesen Patienten signifikant abfielen (35, 100, 103). Als Ursache wird angenommen, dass die Darmmukosa bei dieser optimierten Substratzufuhr ihre Funktion als Barriere zwischen dem Darmlumen und dem Körper suffizienter ausübt. Somit kann ein Übertreten von Keimen und Toxinen aus dem Darm verhindert oder zumindest stark vermindert werden (35, 103). Allerdings konnte bei enteraler Glutaminsubstitution eine Erhöhung des Plasmaglutaminspiegels nicht nachgewiesen werden (41).

Patienten, die Glutamin zusätzlich zur totalen parenteralen Nutrition (TPN) erhielten, wiesen eine signifikant verkürzte Krankenhausverweildauer, eine schnellere Erholung der Lymphozyten, sowie eine verbesserte 6-Monats-Überlebensrate auf (25, 64). Des weiteren fiel der Glutaminspiegel in der Muskulatur signifikant geringer ab. Auch der Proteinmetabolismus war verbessert (28).

Betrachtet man jedoch nicht nur diesen Punkt, sondern den gesamten klinischen Verlauf, so profitierten in den jeweiligen Studien die Patienten in größerem Maße von der parenteralen Glutaminsubstitution, vor allem dann, wenn es darum geht, die bereits eingetretene akute Hyperinflammation zu beeinflussen (71). Als Grund dafür wird vermutet, dass sich der verbrauchte Glutaminpool bei parenteraler Gabe schneller erholt als bei enteraler Substitution (21). Folglich scheint der enterale Weg ideal zu sein für nicht infizierte Patienten, bei denen

eine Erhaltung der Barrierefunktion des Darmes und die Funktion des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes erwünscht ist (32). Für sich bereits in Stress befindliche oder an einer Infektion leidende Patienten ist jedoch eine enterale Glutaminsubstitution ungenügend, weshalb man eine parenterale Zufuhr anstreben sollte (84).

Trotz der erhöhten Glutaminsyntheserate zur Wiederherstellung der Homöostase, scheint es Patienten zu geben, bei denen ein Mangel vermehrt auftritt. Eine besondere Beachtung sollte man Patienten in höherem Alter, mit ausgeprägter Kachexie, pulmonaler Dysfunktion oder kompliziertem postoperativem Verlauf schenken, da bei ihnen Grad und Dauer des Glutaminmangels besonders ausgeprägt sind (23, 27, 72).

### **1.3 Das Immunsystem**

Das Immunsystem besteht aus vielen verschiedenen Subsystemen, die miteinander kommunizieren und gemeinsam der Inaktivierung und Entfernung von Fremdstoffen, Mikroorganismen, Viren, der Abstoßung fremder Zellen und der Verhinderung der Vermehrung veränderter Zellen dienen. Unterteilen kann man dieses System in einen angeborenen und einen erworbenen Teil. Zur angeborenen, unspezifischen Abwehr zählen unter anderem :

- Physikalische Barrieren, wie Haut, Mukosa
- Zelluläre Abwehr, wie Granulozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)
- Chemische Barrieren, wie Komplementfaktoren, Akutphasenproteine, Enzyme, pH

Zur erworbenen, spezifischen Immunität gehören:

- Zelluläre Abwehr, wie Lymphozyten
- Antikörper, die die humorale Abwehr darstellen

(43)

#### *1.3.1 Die unspezifische Abwehr:*

Damit ein Keim eine Infektion verursacht, muss dieser in den Körper eindringen, das Wirtsgewebe kolonisieren und sich dort vermehren. Daraus resultieren Gewebeschäden und Funktionseinschränkungen. Die erste Immunantwort wird durch das unspezifische Immunsystem gestellt. Durch Gewebeschädigung werden zunächst zur Phagozytose fähige Zellen aktiviert und Mechanismen in Gang gesetzt, um zusätzliche Abwehrzellen aus der

Zirkulation zu rekrutieren. Meist wird bereits ein Großteil der eingedrungenen Antikörper durch diese schnellen, aber noch unspezifischen Mechanismen eliminiert (43).

### *1.3.2 Die spezifische Abwehr:*

Das spezifische Immunsystem steigert die Effektivität der Abwehr enorm, jedoch reagiert es deutlich langsamer. Wichtige Mechanismen für die Effektivität sind (43):

- Spezifität (Fokussierung)
- Amplifikationsmechanismen (Komplement-vermittelte Phagozytose, Zellstimulation)
- Zytokinvermittelte Funktionssteigerung der Effektorzellen

Ohne Antigenkontakt ruhen die Immunzellen. Erst der Kontakt mit dem Antigen bewirkt eine funktionelle Aktivierung. Dabei kann man die vier Phasen des spezifischen Immunsystems unterscheiden:

1. Erkennung des Antigens (Erkennungsphase)
2. Aktivierung der Zellen (Aktivierungsphase)
3. Freisetzung von Zytokinen, zytotoxischen Molekülen oder Antikörpern von Lymphozyten (Effektorphase)
4. Abschaltung der Immunantwort (Homöostase)

In der Erkennungsphase geht das Antigen eine Bindung mit den spezifischen Rezeptoren der B- oder T-Lymphozyten ein. Diese Rezeptoren stellen bei den B-Lymphozyten an der Oberfläche exprimierte Immunglobuline (Ig) dar, die sequenzielle oder strukturelle Anteile des Antigens erkennen, welches ein Protein, Polysaccharid oder Lipid sein kann. T-Lymphozyten können Antigene nur mit Hilfe ihrer Rezeptoren erkennen, wenn diese als Peptidfragmente des ursprünglichen Antigens zusammen mit den peptid-präsentierenden Strukturen präsentiert werden (80).

In der Aktivierungsphase werden über die Antigenerkennungsstrukturen an der Oberfläche der Zellen intrazelluläre Mechanismen in Gang gesetzt. Die Aktivierung der B- oder T-Zellen kann sich in Zytokinproduktion, Differenzierung oder Proliferation äußern.

In der Effektorphase kommt es zur Elimination des Antigens. Dabei spielen die Zellen des spezifischen und des unspezifischen Immunsystems eng zusammen. Eine Funktionssteigerung und die Koordination wird maßgeblich durch die Zytokine gesteuert.

Nach der Elimination des Antigens wird wieder ein immunologisches Gleichgewicht zwischen ruhenden und aktivierten Zellen hergestellt (80).

Die Zellen der Abwehr entstehen alle aus einer gemeinsamen Stammzelle, die sich in zwei unterschiedliche Richtungen differenzieren. Bei der myeloiden Entwicklung entstehen Granulozyten und Monozyten, die als Phagozyten eine wichtige Funktion in der Basisabwehr einnehmen. Bei der lymphoiden Entwicklung entstehen die Träger der spezifischen Immunantwort, die T- und B-Lymphozyten (43).

B-Lymphozyten übernehmen zwei wichtige Aufgaben: Sie sind wichtige Antigen-präsentierende Zellen (APZ), die Antigene aufnehmen, prozessieren und den T-Zellen präsentieren. Außerdem sind sie in der Lage, Antikörper zu produzieren, die in zwei verschiedenen Formen vorkommen, einer membranständigen und einer sezernierten. Die membranständige Form stellt den Antigenrezeptor der B-Zellen dar. Nach Antigenkontakt expandieren B-Zellen mit entsprechender Spezifität klonal erheblich. Dies führt innerhalb einiger Teilungsschritte zur Reifung der B-Zellen zu Plasmazellen, die nun den selben Antikörper produzieren und als die sezernierte Form in die Umgebung entlassen. Die wichtigste Eigenschaft der Immunglobuline ist ihre Fähigkeit, spezifisch mit einem Antigen zu reagieren. Ein Antikörper bindet meistens nur ein bestimmtes Antigen mit hoher Affinität, was die Spezifität der Immunantwort bewirkt (43).

Die T-Lymphozyten tragen an ihrer Oberfläche ebenfalls Rezeptoren, die mit sterisch passenden Epitopen Bindungen eingehen können. Diese Rezeptoren sind mit anderen Polypeptiden auf der Oberfläche assoziiert: mit dem CD3-Komplex und, je nach Differenzierung, mit dem CD4- oder CD8-Molekül (CD= cluster of differentiation). Die T-Zellen können nicht direkt durch freie Antigene aktiviert werden. Das Antigen muss zuvor von einer APZ in geeigneter Weise verarbeitet und auf deren Oberfläche zusammen mit speziellen Oberflächenmolekülen, den MHC-Klasse-II-Molekülen (MHC= major histocompatibility complex) präsentiert werden (43). Zu den APZ zählen unter anderem Monozyten, Makrophagen, Astrozyten und dendritische Zellen (80). Um das präsentierte Antigen zu erkennen, tragen die T-Zellen außer dem spezifischen Rezeptor ein MHC-Klasse-I-Molekül auf ihrer Oberfläche. Nach dem jeweiligen Oberflächenmolekül werden die T-Zellen in unterschiedliche Subpopulationen eingeteilt.

Die CD4-T-Zellen erkennen nur MHC-II-assoziierte Antigene, die vor allem von Zellen mit guter Antigenaufnahme, also den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ), angeboten werden. Wegen ihrer wichtigen Funktion in der Kommunikation mit dem B-Zellsystem werden sie auch als T-Helferzellen bezeichnet. Sie produzieren und induzieren

die Produktion von Interleukinen, aktivieren dadurch Makrophagen und regulieren die Funktion von anderen Lymphozyten (43).

In der ersten Phase der T-Helferzellantwort werden die Antigene von APZ aufgenommen und als Peptide präsentiert, so dass sie von T-Helferzellen erkannt werden können. Interleukine und verschiedene andere Faktoren spielen eine wichtige Rolle. In der zweiten Phase erkennen die aktivierten T-Helferzellen die Antigene der B-Zelle, die die gleiche MHC-Klasse-II-Peptidkombination wie die APZ tragen. Die B-Zelle hat zuvor das Antigen über ihren Oberflächenrezeptor erkannt, aufgenommen, prozessiert und präsentiert Teile als lineare Peptide in MHC-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche.

Als induktiver Stimulus für die B-Zellen dienen lösliche Botenstoffe aus den T-Helferzellen, die Zytokine (Interleukine). Aufgrund der vorwiegenden IL-Muster von T-Helferzellen lassen sich 2 Subpopulationen unterscheiden:

Die T-Helfer-1 (Th1)-Antwort ist charakterisiert durch frühe Interferon (IFN)- $\gamma$ -Produktion, erhöhte Phagozytoseaktivität und Elimination des Antigens durch IFN- $\gamma$ -aktivierte Makrophagen, sowie durch Immunglobulin G2 (IgG2)-Produktion, Bildung von komplementbindenden, opsonierenden Antikörpern und durch zytotoxische T-Zell-Antworten. Infektionen allgemein, vor allem durch intrazelluläre Parasiten, induzieren eine starke Th1-Antwort (80).

Die Th2-Antwort führt zur frühen IL-4 Freisetzung. Th2-Zellen rekrutieren eosinophile Granulozyten und induzieren die Produktion und Freisetzung von IgG1 und IgE. Wurm- und viele andere Parasiten führen zu einer starken Th2-Antwort. Aber auch Allergiker und Atopiker leiden unter einer übermäßigen pathologischen Th2-Antwortbereitschaft.

Andere Zytokine können nicht eindeutig den Th1- oder Th2- Zellen zugeordnet werden. Die Unterscheidung ist nicht immer ganz strikt und oft ist eher ein tendenzieller als ein absoluter Unterschied der Zytokinproduktion zu messen. Dennoch ist diese Unterteilung wertvoll, da sie unterschiedliche Immunreaktionen und somit unterschiedliche Krankheitsmanifestationen erklärt (80).

Die CD8-T-Zellen erkennen nur MHC-I-assoziierte Antigene. Diese Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen erkannt, weil sie histokompatible, virusinfizierte oder anders infizierte Zellen erkennen und zerstören können. Sie erkennen meist Peptide endogener Herkunft, die entweder von der Zelle selbst oder von intrazellulären Parasiten in Zellen synthetisiert werden, immer in Kombination mit MHC-Klasse-I. CD8-Zellen können entweder über Kontakt und enzymatischer Zelllyse mit Perforin zytotoxisch wirken oder über Interleukinfreisetzung (vor allem IFN $\gamma$ ) nichtzytotoxische Effektorfunktionen vermitteln (43).

### 1.3.3 Zytokine

Der Term Zytokine oder Immunozytokine wurde ursprünglich benutzt, um eine Gruppe von immunmodulierenden Proteinen von anderen Wachstumsfaktoren zu trennen, die die Proliferation und Bioaktivität von Nicht-Immunzellen regulieren. Diese begriffliche Trennung entpuppte sich aber in Wirklichkeit als nicht so deutlich, da manche Zytokine von nur bestimmten Zellen sezerniert werden, während andere von einem ganzen Spektrum an bekannten Zellen produziert werden. So erwies sich die anfänglich angenommene These „ein Produzent - ein Zytokin - eine Zielzelle“ als falsch, welche mit beinahe jedem weiter erforschten Zytokin bestätigt wurde. Eine Definition dieser Faktoren aufgrund ihrer Produzenten oder Zielzellen bleibt deshalb problematisch. Heute wird der Begriff Zytokine für eine unterschiedliche Gruppe von löslichen Proteinen und Peptiden benutzt, die im nano- und picomolaren Bereich als humorale Regulatoren agieren. Sie kontrollieren unter normalen oder pathologischen Bedingungen die Aktivität von verschiedenen Zellen und Geweben (11, 37).

Zytokine werden von aktivierten T-Zellen und anderen Zellen während der natürlichen und spezifischen Immunantwort freigesetzt. Sie haben multiple, insbesondere inflammatorische, immunregulatorische, die Hämatopoese steuernde und chemotaktische Funktionen. Außerdem kontrollieren sie die Produktion weiterer Zytokine und können die Synthese von Proteinen verstärken oder vermindern (11). Daraus resultiert ein fein abgestimmtes Netzwerk, das die Eradikation des eingedrungenen Mikroorganismus zum Ziel hat (11). Das Unvermögen, bestimmte Zytokine (in ausreichendem Umfang) als Reaktion auf eine Infektion zu bilden, bestimmt oft den klinischen Verlauf der Erkrankung und kann großen Einfluss auf das „Outcome“ des Patienten haben (11). Unter bestimmten Umständen kann aber auch eine massive Überproduktion von bestimmten Zytokinen zu Schock, Multiorganversagen oder sogar zum Tode führen (11).

Je nach Ursprung des Zytokins werden auch folgende Begriffe verwendet: Monokine für Interleukine, die von Makrophagen produziert werden und Lymphokine für solche, die von Lymphozyten produziert werden. Der Begriff Interleukine wird für Zytokine verwendet, die hauptsächlich Zellinteraktionen beeinflussen. Die lokal produzierten Zytokine können in der Nähe des Produktionsortes (parakrin) oder auch auf die produzierende Zelle selbst (autokrin) wirken, jedoch können manche dieser Faktoren auch systemisch wirksam werden (43). Die meisten Zytokine werden in der Zelle nicht gespeichert und die Expression unterliegt einer strikten Kontrolle. Das bedeutet, dass normalerweise Zytokine nur von aktivierten Zellen als Reaktion auf einen bestimmten Stimulus gebildet werden (37). Durch Interaktionen mit hochspezifischen Zellrezeptoren induzieren Zytokine zellspezifische oder auch allgemeine

Effekte, beispielsweise Freisetzung von Mediatoren, Expression von Differenzierungsmolekülen oder Regulation der Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle (80).

Unterschiedliche Zytokine können bei verschiedenen Zellen die gleiche Wirkung hervorrufen. Sie sind damit funktionell redundant. Ein Zytokin kann aber auch mehrere unterschiedliche Reaktionen bei verschiedenen Zellen erzeugen und hat somit pleiotrope Wirkung (37). Gewisse Zytokine aktivieren bevorzugt bestimmte Effektorzellen beziehungsweise fördern deren Reifung. Insofern kann die Immunantwort, je nach Zytokinmuster, qualitativ unterschiedlich ausfallen.

Die Funktionen der einzelnen Zytokine lassen sich wie folgt zusammenfassen (43):

- Entzündungshemmend: IL-10, IL-13, TGF- $\beta$
- Entzündungsfördernd: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$
- Hämatopoiesefördernd: IL-3, IL-5, IL-7
- Immunregulatorisch: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$
- Antiinfektiös: IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TNF- $\alpha$
- Antiproliferativ: IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$

In der folgenden Tabelle sind die Zytokine aufgeführt, die in dieser Dissertation untersucht wurden. Da ein Schwerpunkt auf die T-Lymphozyten fällt, werden auch nur Interleukine beobachtet, die von diesen Zellen produziert werden.



**Tabelle 1: Auflistung der untersuchten Zytokine**

Akronym	Weitere Bezeichnungen	Quelle	Zielzellen	Biologische Aktivität
<b>IL-1</b>	Lymphocyte activating factor, Leukocytic pyrogen, Endogenous pyrogen, Mononuclear cell factor, B-cell activating factor	Monozyten/Makrophagen T-Zellen B-Zellen NK-Zellen Endothelzellen Astrozyten Langerhans Zellen Keratinocyten	T-Zellen B-Zellen NK-Zellen Eosinophile Endothelzellen Adipozyten Chondrozyten	Proinflammatorische Wirkung, Aktivierung von B- und T-Zellen, Aktivierung von Makrophagen, Induktion von Fieber, Degranulation von eosinophilen Granulozyten, Synthese von akute Phase Proteinen
<b>IL-2</b>	Lymphocyte mitogenic factor, T-cell growth factor	T-Zellen (Th0, Th1) CD4 >>CD8 (B-Zellen) (NK-Zellen)	T-Zellen B-Zellen NK-Zellen Monozyten/ Makrophagen	Differenzierung und Proliferation von T- und B-Zellen, Sekretion von Immunglobulinen bei B-Zellen, Proliferation von NK-Zellen, Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ ,
<b>IL-8</b>	Neutrophil attractant activating protein-1, Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor, Neutrophil activating factor, Granulocyte chemotactic protein, Cytokine synthesis inhibitory factor	Monozyten/Makrophagen T-Zellen Fibroblasten Synovial-Zellen Endothelzellen Epithelzellen	Neutrophile T-Zellen Basophile	Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, Degranulation lysosomaler Enzyme neutrophiler Granulozyten
<b>IL-10</b>		T-Zellen (Th0, Th2) B-Zellen Monozyten/Makrophagen	B-Zellen Th1-Zellen Monozyten Makrophagen NK-Zellen	Hemmung der Th1-Differenzierung und Synthese von Th1-Zytokinen, Stimuliert B-Zell Proliferation,

#### 1.4 Kardiochirurgie und das Immunsystem

Mit Zunahme des durchschnittlichen Alters der Bevölkerung, vor allem in den Industrieländern, und dem damit verbundenen Anstieg an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, gewinnt die Herzchirurgie einen immer wichtigeren Stellenwert in der operativen Medizin.

Da viele Operationen nur am stillstehenden und eröffneten Herzen durchgeführt werden können, begann der Fortschritt in der modernen Herzchirurgie erst 1953 mit der Einführung der Herz-Lungen-Maschine (HLM). Zwar sind durch den Einsatz der HLM die Möglichkeiten an operativen Eingriffen gestiegen, allerdings muss sich die Forschung seitdem mit neu entstandenen Komplikationen auseinander setzen.

Durch den mechanischen Transport in der HLM wird das Blut erhöhten Scherkräften ausgesetzt und die verschiedenen Blutbestandteile kommen in Kontakt mit künstlichen, nicht-endothelialen Oberflächen (73, 96). Daraus resultieren Probleme wie Hämolyse, Thrombozytopenie, sowie die Aktivierung als auch der Verbrauch von Komplementfaktoren und Zellen des Immunsystems. All diese Faktoren führen zu Veränderungen im Ablauf der

Immunantwort, woraus ein systemisch inflammatorisches Antwortsyndrom (Systemic Inflammatory Response Syndrome = SIRS) resultieren kann (47, 73).

Als weitere Ursachen für die beeinflusste Immunreaktion werden unter anderem die Ischämie-Reperfusionsschädigung, Endotoxinämie, Hypothermie, Transfusion und das operative Trauma in Betracht gezogen (22, 58). Durch die Inflammation kann es zur Entwicklung von postoperativen Komplikationen, wie myokardialer Dysfunktion, Gerinnungsstörungen, Atemversagen, renaler und neurologischen Dysfunktionen, veränderte Leberfunktion bis schließlich zum Multiorganversagen (MOF) kommen (55, 73, 96).

Die Aktivierung bestimmter Faktoren des Immunsystems durch die HLM führt zu relevanten Veränderungen der zellvermittelten Immunantwort. Daraus resultiert eine stark erhöhte Prävalenz für Infektionen, eine der häufigsten postoperativen Komplikationen. Die Kapazitäten des Immunsystems zur Bekämpfung von Keimen ist durch den Verlust an Komplementfaktoren und die reduzierte Anzahl der Zellen des Immunsystems eingeschränkt (28, 33). Besonders stark reduziert ist die Anzahl an T-Lymphozyten (13), die außerdem eine verminderte proliferative Reaktion auf mitogene Stimuli aufweisen (34, 67).

Bezüglich der veränderten postoperativen Immunantwort verglichen Hisatomi et al. (34) drei Patientenkollektive miteinander: Patienten, die cholezystektomiert wurden, Patienten mit kardiochirurgischen Eingriffen unter Einsatz der HLM, die keine Bluttransfusionen erhielten und Patienten mit kardiochirurgischen Eingriffen unter Einsatz der HLM, die Bluttransfusionen erhielten. Es konnte in der Studie weder eine Verminderung der IL-2 Produktion noch eine Abnahme der Anzahl an T-Lymphozyten bei Patienten nach Cholezystektomie nachgewiesen werden, während beide Werte stark in den beiden Gruppen der kardiochirurgischen Patienten abfielen. Die IL-2 Produktion erreichte nach drei Tagen wieder beinahe den Ausgangswert in der Gruppe der kardiochirurgischen Patienten, die keine Bluttransfusionen erhielten, während sie zu diesem Zeitpunkt bei denjenigen, die Transfusionen erhielten, noch durchschnittlich um 40% erniedrigt war. In beiden kardiochirurgischen Gruppen erholte sich die T-Zellpopulation bezüglich ihrer Anzahl wieder bis zum dritten postoperativen Tag. Allerdings war keine Korrelation zwischen Dauer des Einsatzes der HLM, Volumen an Bluttransfusion und IL-2 Produktion in der Patientengruppe, die Bluttransfusionen erhielten, zu erkennen.

Die Ergebnisse der erwähnten Studien scheinen zu verdeutlichen, dass eine Veränderung der Immunreaktion von mehreren Faktoren abhängt. Im Vergleich mit anderen operativen Fachrichtungen sind offenbar die kardiochirurgischen Patienten durch den Einsatz der HLM und die häufige Anwendung von Bluttransfusionen besonders von diesem Phänomen betroffen. Deshalb muss man sich für dieses besondere Kollektiv weiterhin mit neuen

Therapiemöglichkeiten auseinander setzen, um die erhöhte Prädisposition für Infektionen, Mortalität, Morbidität und den verlängerten Krankenhausaufenthalt positiv beeinflussen zu können (3, 59).

### **1.5 Glutamin und das Immunsystem**

Glutamin hat für die Zellen des Immunsystems eine wichtige Funktion. Wie bereits erwähnt dient es als Substrat zur Purin-, Pyrimidin- und Proteinsynthese und als Energiequelle für Lymphozyten (6, 70). Ein adäquates Angebot an Glutamin ist mitverantwortlich für die optimale Funktion vor allem der Proliferation und Sekretion durch Immunzellen.

Chang et al. (9) konnten die Bedeutung von Glutamin für stimulierte Lymphozyten nachweisen, da deren Proliferationsrate nach Supplementierung der Aminosäure signifikant anstieg, während sich ohne Glutamin kaum eine Reaktion abzeichnete. Außerdem war es vor allem die Zytokinantwort der Th1-Zellen, die von einer optimierten Glutaminkonzentration abzuhängen schien.

Kew et al. (45) konnten bei Mäusen, die eine glutaminhaltige Ernährung erhielten, zeigen, dass die IL-2 Produktion und IL-2 Rezeptorexpression signifikant erhöht war. Da dieses Zytokin die Teilung von T-Lymphozyten induziert, stellten Kew et al. die These auf, dass Glutamin nicht direkt Einfluß auf die gesteigerte Proliferationsrate von T-Zellen hat, sondern indirekt über den Weg der erhöhten IL-2-Produktion. Diese These konnte in einer Untersuchung an Patienten nach Kolon- bzw. Rektumresektion bestätigt werden. Die Anzahl der Lymphozyten war in der Glutamingruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (64).

### **1.6 Gibt es ein Patientenkollektiv, das besonders von Glutamin profitiert?**

Infektionen und die daraus entstehenden Komplikationen sind ein ernstzunehmendes Problem bei chirurgischen Patienten und ein entscheidender Faktor für das klinische Outcome. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Entstehung postoperativer Infektionen nicht nur von der bakteriellen Kontamination während der Operation abhängen, sondern auch auf ein perioperatives immunologisches Defizit und eine verminderte akute Phase-Reaktion zurückzuführen sind (19, 57). Wie schon erwähnt ist die Operation am offenen Herzen als besonderes Trauma zu sehen, da zu der chirurgischen Gewebsverletzung unter anderem noch der Einfluss von Hypoperfusion, Hypothermie und der Einsatz der HLM auf das Immunsystem einzubeziehen sind (22, 58).

Einige Untersucher nehmen sogar an, dass das Auftreten von postoperativen Infektionen maßgeblich mit einer vorbestehenden oder perioperativ erworbenen eingeschränkten Funktion

des Immunsystems in Verbindung steht (22, 47, 50, 58, 73). Von besonderem Interesse ist die Frage, mit Hilfe welcher Parameter Patienten frühzeitig erkannt werden können, um nach ihrem Immunstatus und dem damit verbundenen Risikoprofil für den postoperativen Verlauf in unterschiedliche Gruppen eingeteilt zu werden (50).

Kress et al. (51) haben ein Patientenkollektiv definiert, das bezüglich der Entwicklung von postoperativen Infektionen ein besonders großes Risiko darstellt. In Studien konnten sie zeigen, dass Patienten, die im Rahmen einer präoperativen Untersuchung eine anerge Hautreaktion vom verzögerten Typ auf einen Intrakutantest (delayed-type hypersensitivity = DTH) aufwiesen, nach kardiochirurgischen Eingriffen ein signifikant erhöhtes Risiko zeigten, an Infektionen zu erkranken (50, 51). An Immunreaktionen vom verzögerten Typ sind besonders die Th1-Zellen beteiligt (77).

Das Patientenkollektiv, welches von Glutamin als Immunnutrition im postoperativen Verlauf besonders aufgrund von Mangelernährung mit dieser Aminosäure profitiert, ist nicht eindeutig definiert. Deshalb stellt sich die Frage nach einem weiteren Screeningparameter, der bei der Bestimmung eben dieses Kollektives hilft und der neben einem erhöhten Risiko zur Entstehung von postoperativen Infektionen auch die Patienten erkennt, die ein immunnutritives Defizit aufweisen. Dafür scheint als Parameter die absolute Lymphozytenzahl geeignet, die eine gewisse Korrelation zu den Ergebnissen des Intrakutantest aufweist und des weiteren den Grad der Immunkompetenz zu beschreiben scheint, der ab Zellzahlen unter 1200/ $\mu$ l eingeschränkt ist (42, 90). Außerdem ist dieser Parameter auch Ausdruck einer Ernährungsstörung, da gerade die Lymphozytenzahl dazu genutzt wird, eine Mangelernährung festzustellen (42, 90).

## **1.7 Fragestellung**

Die Ergebnisse aus experimentellen und klinischen Untersuchungen haben gezeigt, dass immunkompetente Zellen im Zustand der Aktivierung einen erhöhten Bedarf an Glutamin haben. Das klinische „Outcome“ scheint durch eine Supplementierung positiv beeinflusst zu werden.

Ziel der geplanten Untersuchung ist es zu prüfen, ob durch die perioperative Verabreichung von Glutamin die infektiöse Morbidität reduziert und die Funktion der Leukozyten (Lymphozyten) nach kardiochirurgischen Eingriffen aufrecht erhalten werden kann. Verglichen wurden diese Patienten mit zwei Gruppen: die eine erhielt eine glutaminfreie, isonitrogene Aminosäurelösung, die andere eine Kontrolllösung (NaCl 0,9%).

Für die Untersuchung und die Auswertung dieser Studie ergaben sich dabei folgende konkrete Fragen:

1. Wird bei kardiochirurgischen Eingriffen durch die perioperative Gabe von Glutamin das intrazelluläre Zytokinmuster von IL-1, IL-2, IL-8 und IL-10 produzierenden T-Lymphozyten verändert?
2. Wird der Plasmaspiegel von Glutamin beeinflusst?
3. Verändert sich die Inzidenz von Infektionen?

## 2. Patienten und Methoden

### 2.1 Patienten

Bei dieser Studie der Abteilung Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität in Giessen handelt es sich um eine prospektive, randomisierte, verblindete Untersuchung mit drei Untersuchungsarmen.

Nachdem die lokale Ethikkommission die Untersuchung (Nr. 41/03) genehmigt hatte, wurde die Studie im Jahr 2003 durchgeführt. Insgesamt nahmen an ihr 79 schriftlich einwilligende Patienten, aus der Abteilung für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie des Uniklinikums Giessen, sowie aus der Abteilung für Herzchirurgie der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim teil. Vorab wurden Parameter wie Operationstechnik, Operationsablauf und Patientenmanagement der beiden Kliniken miteinander verglichen, da eine Gleichartigkeit dieser Faktoren unbedingte Voraussetzung für die Auswertung der gewonnenen Daten darstellt.

Die teilnehmenden Personen wurden in 3 Gruppen eingeteilt, die sich durch eine unterschiedliche intra- und postoperative Ernährung voneinander unterscheiden.

Einschlusskriterien für einen Patient in die Studie:

- Elektive Herzchirurgie mit extrakorporaler Zirkulation
- Ejektionsfraktion  $\leq 40\%$  oder Alter  $\geq 70$  Jahre
- Absolute Lymphozytenzahl unter  $1200/\mu\text{l}$

Ausschlusskriterien für einen Patienten in die Studie:

- Alter  $\leq 21$  Jahre
- Frauen in der Schwangerschaft oder Stillzeit
- Kortikoid- oder immunsuppressive Therapie
- Patienten mit einer Autoimmunerkrankung
- Nichtsteroidale antiinflammatorische Medikation (Langzeittherapie)
- Diagnostiziertes Malignom
- Schwere Leber- (GOT, GPT  $> 300$  U/l, CHE  $< 1000$  U/l) und/oder Nierenerkrankung (Kreatinin  $> 2$  mg/dl, Harnstoff  $> 180$  mg/dl)
- Patienten mit einem Diabetes mellitus

Patientenzahl: 79

## 2.2 Studiendesign

Die Patienten wurden in die folgenden 3 Gruppen eingeteilt:

1. Die Glutamingruppe; in dieser Gruppe wurden glutaminhaltige Aminosäurelösungen verabreicht.
2. Die Aminosäurengruppe; die Patienten dieser Gruppe erhielten glutaminfreie Aminosäurelösungen.
3. Die Kontrollgruppe, dieser Gruppe wurde reine Kochsalzlösung infundiert.

### *Substitutionsschema:*

In allen drei Gruppen wurden die Nährlösungen intra- und postoperativ bis zum 2. Tage ausschließlich parenteral substituiert.

1. Glutamin (Dipeptamin®, Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg)
2. Aminosäuren (Aminoplasma®-10%, Fa. B. Braun Melsungen AG)
3. Kontrolle (NaCl 0,9%)

### Dosierung:

zu 1.: 0,735 g/kg L-Alanyl-L-Glutamin (=0,5 g/kg Glutamin)

plus 0,1 g/kg standardisierte Aminosäurelösung

plus 0,4 g/kg Glukose

ad 1000 ml NaCl 0,9%

zu 2.: 0,835 g/kg standardisierte Aminosäurelösung

plus 0,4 g/kg Glukose

ad 1000 ml NaCl 0,9%

zu 3.: 1000 ml NaCl 0,9%

Die teilnehmenden Patienten erhielten drei Infusionslösungen á 1000 ml. Mit Einleitung der Narkose wurde auch mit der Substitution der Infusionen begonnen bei einer Flussrate von 100 ml/h. Bis zum zweiten postoperativen Tag wurden täglich jeweils 1000 ml infundiert.

### *Hauptzielkriterien:*

1. Messung der IL-2-Produktion von Lymphozyten nach Stimulation am 2. postoperativen Tag. Bestimmt wird die Detektion von intrazellulärem IL-2 in T-Zellen.
2. Infektionsrate (Summe der Anzahl pro Tag)

#### Definitionen:

- A. Eine Pneumonie wird definiert als ein neues Infiltrat oder die Vergrößerung eines Infiltrates auf einer Lungenaufnahme und mindestens eines der folgenden Kriterien:

- Leukozytenzahl  $> 1200/\mu\text{l}$
- Rektale Temperatur  $> 38,3^{\circ}\text{C}$
- Nachweis von pathogenen Keimen im Sputum
- Hinweis auf eine Infektion durch Anreicherung von Leukozyten

- B. Definition einer Sepsis nach den Kriterien von Bone et al. (4):

- a. Klinischer Hinweis einer Infektion
- b. Rektale Temperatur  $> 38,3^{\circ}\text{C}$
- c. Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$
- d. Spontane Atemfrequenz  $> 20/\text{min}$

und zusätzlich mindestens eines der folgenden Kriterien

- Inadäquate Organperfusion oder Organdysfunktion
- Beeinträchtigung der Vigilanz
- Arterielle Sauerstoffsättigung  $< 75\%$  bei Raumluft
- Serum- Laktat  $> 2,2\text{mmol/l}$
- Oligurie bei einer Urinausscheidung  $< 0,5\text{ ml/kg/h}$  über mindestens zwei aufeinander folgende Stunden bei adäquater Flüssigkeitszufuhr

Eine sepsisverursachende Bakteriämie wird diagnostiziert, wenn eine positive Blutkultur zusammen mit Fieber (Temperatur  $> 38,3^{\circ}\text{C}$ ) oder mit einer Leukozytose (Leukozytenzahl  $> 12 \times 10^9/\text{l}$  Blut) festgestellt wird.

- C. Eine intrathorakale Infektion liegt per Definition vor, wenn mindestens eine zusätzliche operative oder perkutane Drainage notwendig wird. Tiefe Wundinfektionen schließen die Beteiligung von Faszien oder tieferen Geweben ein.
- D. Eine positive Blutkultur eines zentralen Venenkatheters und eine positive Blutkultur mit Absinken des Fiebers nach Entfernen des Katheters werden als Katheterinfektion definiert.



- E. Eine Infektion des Urogenitalsystems liegt vor bei einer Isolation von mindestens 10 Kolonien pro Milliliter Urin
- F. Eine Sinusitis wird definiert als eine radiologische Verschattung zusammen mit Fieber.

Bei Verdacht auf eine Infektion wurde Blut, Sputum und andere Körperflüssigkeiten asserviert. Alle acht Stunden wurden die Patienten bezüglich klinischer Zeichen einer Infektion untersucht.

*Nebenzielkriterien:*

1. Veränderung der zellulären Immunantwort in Bezug auf Detektion intrazellulärer Zytokine nach Stimulation von T-Lymphozyten. Dabei werden folgende Zytokine assoziiert mit einer
  - a. proinflammatorischen Antwort:  
Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 8 (IL-8)
  - b. antiinflammatorischen Antwort:  
Interleukin 10 (IL-10)
2. Glutamin- Spiegel im Plasma

*Messzeitpunkte:*

Die verschiedenen Parameter zur Bestimmung der Untersuchungskriterien wurden bei jedem Patient zu 5 definierten Zeitpunkten gemessen. Dazu wurde jeweils 20 ml Blut in dafür vorgesehene Röhrchen mit Na-Heparinat abgenommen.

- |                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| Messzeitpunkt 1: | Narkosebeginn                       |
| Messzeitpunkt 2: | Operationsende                      |
| Messzeitpunkt 3: | erster postoperativer Tag 8.00 Uhr  |
| Messzeitpunkt 4: | zweiter postoperativer Tag 8.00 Uhr |
| Messzeitpunkt 5: | dritter postoperativer Tag 8.00 Uhr |

Als Begleitkriterien wurden folgende Parameter in die Auswertung miteinbezogen:

- Krankenhausverweildauer (Tage)
- Intensivliegedauer (Tage)
- Antibiotikabedarf (Summe der Anzahl der Medikamente pro Tag)
- C-reaktiven Proteins (mg/l)

- Herz/Kreislauf: Anzahl und Dauer von applizierten Katecholaminen und „Assist-Device“ (Stunden)
- Beatmung (Stunden)
- Neurologie: Desorientiertheit (Tage)
- Niere: Kreatinin (mg/dl); Harnstoff (mg/dl); Furosemid, kumulativ (mg)
- Leber: GOT, GPT (U/l)
- Rate an Organversagen (SOFA-Score am ersten, zweiten und dritten postoperativen Tag)
- Transfusionsmenge (Erythrozytenkonzentraten, Frischplasmen und Thrombozytenkonzentraten)
- Art der Kardioplegie

### 2.3 Op-Ablauf

Die Patienten erhielten am Vorabend der Operation 2 mg Flunitrazepam und weitere 2 mg Flunitrazepam mit 30 mg Morphin als orale Prämedikation eine Stunde vor dem Transport in den Operationsraum. Die intravenöse Narkoseeinleitung erfolgte standardisiert mit Sufentanil (0,2-0,3 µg/kg Körpergewicht), Midazolam (0,05-0,1 µg/kg Körpergewicht) und Pancuroniumbromid (0,1 µg/kg Körpergewicht). Alle Patienten wurden orotracheal intubiert und Volumen-kontrolliert beatmet (Servo 900C, Siemens, Erlangen), so dass der  $\text{paCO}_2$  im Bereich von 34-44 mm Hg lag. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden kontinuierlich bedarfsadaptiert Propofol und in Abständen von 30 Minuten 25 µg Sufentanil verabreicht. Das invasive hämodynamische Monitoring erfolgte anhand einer Kanüle in der A. radialis zur Blutdruckmessung und über einen Pulmonalarterienkatheter (PA-VIP-Katheter, Edwards Lifescience, Irvine, USA).

Die Antikoagulation wurde mit 300 U/kg Heparin vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) durchgeführt. Die EKZ wurde in moderater Hypothermie (rektale Temperatur 33°C) mit non-pulsatilem Fluss (2,4 l/min/m<sup>2</sup>) und monoatrialer Kanüle durchgeführt. Der systemische Blutdruck lag bei 40-80 mm/Hg. Der Gasaustausch erfolgte über einen Membranoxygenator (Maxima Plus, Medtronic, Anaheim, CA). Das pH-Management folgte der alpha-stat-Methode. Der Hämatokrit wurde während der EKZ zwischen 20 und 30% gehalten. Die Herz-Lungen-Maschine wurde mit 2000 ml Ringerlösung und 250 ml 5%iger Albuminlösung gefüllt. Zur Kardioplegie wurde Brettschneider-, Calafiore-Lösung oder Blutkardioplegie verwendet. Vor dem Entwöhnen von der EKZ wurden die Patienten mit dem integrierten Wärmeaustauscher des Oxygenators und mit einer Wärmematte bis zu einer rektalen Temperatur von 35°C

aufgewärmt. Die Reperfusionszeit vor dem „Weaning“ von der EKZ betrug ein Drittel der Ischämiephase. Das „Weaning“ von der EKZ wurde durch ein graduelles Füllen des Herzens bis zu einem systolischen Blutdruck von 90-100 mm/Hg oder einem maximalen diastolischen Pulmonalarteriendruck von 20 mm/Hg und der sukzessiven Rücknahme des EKZ-Flusses durchgeführt. Inotropika wurden nicht routinemäßig benutzt. Inotropika wurden dann eingesetzt, wenn die kardiale Kontraktilität während und nach dem „Weaning“ eingeschränkt war. Diese Einschätzung wurde entweder durch direkte visuelle Inspektion des rechten Ventrikels und/oder durch transösophageale Echokardiographie getragen. Weiterhin wurden Inotropika auch eingesetzt, wenn der mit Thermodilution gemessene Herzindex unter  $2 \text{ l/min/m}^2$  war. Die Heparinwirkung wurde mit Protamin im Verhältnis eins zu eins zur Heparindosis antagonisiert.

## **2.4 Prinzip: Vom Vollblut bis zur Messung**

Der Ablauf der Aufarbeitung des heparinisierten Vollblutes von der Stimulation bis zur quantitativen Bestimmung der zytokinproduzierenden T-Lymphozyten läßt sich in folgenden 3 Stufen unterteilen:

1. Aktivierung
2. Markierung und Reinigung
3. Messung

Das Prinzip dieser 3 Teilschritte lässt sich an Hand der stimulierten Proben folgendermaßen erläutern:

### **1. Aktivierung:**

- T-Lymphozyten produzieren unter physiologischen Bedingungen nur sehr wenig bis gar keine Zytokine, da sie durch körpereigene Regulationsmechanismen kontrolliert werden. Somit soll eine nicht angemessene, überschießende Immunreaktion verhindert werden. Deshalb müssen sie in vitro stimuliert werden, was in dieser Versuchsreihe mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Ionomycin geschieht. Diese Kombination aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade, die die Produktion von Zytokinen unterstützt.
- Da später die Quantität der zytokinproduzierenden T-Lymphozyten bestimmt werden soll, ist es von großer Wichtigkeit, dass die Zellen die von ihnen synthetisierten Proteine nicht mehr abgeben können. Aus diesem Grund wird der Blutprobe der Proteininhibitor Brefeldin A (BFA) zugeführt. BFA bindet die von der Zelle produzierten Proteine, in diesem Fall die Zytokine, am Golgiapparat und verhindert

damit deren Sekretion. Durch die Markierung der gebundenen Zytokine ist die spätere quantitative Messung der zytokinproduzierenden T-Zellen möglich.

- Den Abschluss dieser Phase bildet die 8-stündige Inkubationszeit in einem abgedunkelten Brutschrank bei Körpertemperatur und einer CO<sub>2</sub>-Luftkonzentration von 7 %.

## 2. Markierung und Reinigung:

- Um in der späteren Messung die zytokinpositiven T-Lymphozyten von anderen Zellen unterscheiden zu können wird der Blutprobe der fluoreszierende Antikörper CD3PerCP zupipetiert. Dieser bindet an den CD3-Rezeptor, der nur von T-Lymphozyten exprimiert wird und lässt somit deren eindeutige Erkennung zu.
- Anschließend werden die Erythrozyten durch Zugabe von FACS-Lysing-Solution in leicht hypotonem Milieu zerstört. Durch dieselbe Lösung werden gleichzeitig die T-Lymphozyten fixiert. Das bedeutet, dass sie in ihrem derzeitigen Ist-Zustand verweilen und keine weitere Protein bzw. Zytokinsynthese betreiben.
- Nach dem Zentrifugieren der Reagenzröhrchen, wobei sich die intakten Lymphozyten absetzen, wird der Überstand mit den lysierten Erythrozyten verworfen und FACS-Permeabilising-Solution zugeführt. Diese Lösung führt zur Bildung von Löchern in der Lymphozytenmembran, so dass ein Eindringen von fluoreszenzmarkierten Anti-Zytokin-Antikörpern in die Zelle möglich wird.
- Die Lymphozytensuspension wird nun in einem Waschschrift von noch in den Reagenzröhrchen befindlichen Zellbestandteilen und Reagenzien gereinigt. Als Waschsubstanz wird PBS zugeführt, anschließend werden die Röhrchen erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Danach werden die durch die anfängliche Stimulation produzierten Zytokine, welche sich in gebundener Form am Golgiapparat befinden, durch Zytokin-Antikörper markiert.
- Zum Abschluss folgt ein letzter Waschschrift mit PBS, bevor die Proben zum Messen bereit stehen.

## 3. Messung

- Im letzten Schritt werden die Proben einzeln gemessen und danach analysiert.

Die unstimulierten Proben dienen der Kontrolle der bereits in vivo zur Zytokinproduktion angeregten T-Lymphozyten. Von den eben beschriebenen Arbeitsschritten unterscheidet sich

deren Aufarbeitung nur dadurch, dass sie im ersten Schritt nicht mit PMA und Ionomycin aktiviert werden.

Der Erkennung, dass eine Stimulation zu Beginn stattgefunden hat, dient die Aktivierungskontrolle. Sie unterscheidet sich in der Aufarbeitung von den stimulierten Proben dadurch, dass zu Beginn der Stimulation nicht der Proteinbinder BFA zugeführt wird. Dadurch können die Zellen im Falle einer Aktivierung weiterhin alle translatierten Proteine weitertransportieren, ebenso den CD69-Rezeptor, der nur von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Um anhand dieses Moleküls die Aktivierung der Zellen quantitativ erfassen zu können, wird zu Beginn des 2. Teilschrittes außer CD3PerCP auch CD69PE zugeführt. Dabei handelt es sich um einen fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen den CD69 Rezeptor.

## **2.5 Laborprotokoll der Markierung intrazellulärer Zytokine**

### *2.5.1 Vorbereitung der Reagenzien*

#### **Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)**

Das PMA wird als 1 mg Pulver geliefert und mit 10 ml Dimethylsulfonid (DMSO) in Lösung gebracht mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Diese kann in 25 µl Aliquots bei einer Temperatur von -20°C gelagert werden. Bei Bedarf wird das aufgetaute PMA mit Phosphat buffered Saline (PBS) im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die entstandene StockII- Lösung hat eine PMA- Konzentration von 1 ng/µl. Das PMA wird in einer Endkonzentration von 10 ng/µl Vollblut verwendet. Das entspricht 10 µl StockII- Lösung pro ml Blut.

#### **Ionomycin**

Das Ionomycin wird als 1 mg Pulver geliefert und mit 2 ml Ethanol in Lösung gebracht mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml. Diese kann in Aliquots bei einer Temperatur von -20°C gelagert werden. Bei Bedarf wird das aufgetaute Ionomycin mit PBS im Verhältnis 1:10 zu StockII- Lösung verdünnt. Die vorliegende Konzentration beträgt dann 0,05 µg/µl. Das Ionomycin wird in einer Endkonzentration von 1 µg/ml Vollblut verwendet. Das entspricht 20 µl StockII- Lösung pro ml Blut.

#### **Brefeldin-A (BFA)**

Das BFA wird als 5 mg Pulver geliefert und mit 1 ml DMSO in Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml gebracht. Diese kann in 25 µl Aliquots bei einer Temperatur von -20°C gelagert werden. Bei Bedarf wird das aufgetaute BFA mit PBS im Verhältnis 1:10 zu StockII- Lösung verdünnt. Die vorliegende Konzentration beträgt nun 0,5 µg/µl. Das BFA wird

in einer Endkonzentration von 10 µg/ml Vollblut verwendet. Das entspricht 20 µl StockII-Lösung pro ml Blut.

#### RPMI-1640

Das RPMI-1640 wird im Kühlschrank bei 2-4°C gelagert.

#### Phosphate buffered Saline (PBS)

PBS ohne NaN<sub>3</sub>, steril gefiltert wird bei Raumtemperatur gelagert.

#### Ethanol

Ethanol wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### Monoklonale Antikörper, fluoreszenzmarkiert

Die Antikörper werden im Kühlschrank bei 2-4°C gelagert.

#### Facs-Lysing-Solution

Die Facs-Lysing-Solution wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und bei Bedarf mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

#### FACS-Permeabilizing-Solution

Die FACS-Permeabilizing-Solution wird bei Raumtemperatur gelagert und bei Bedarf mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 verdünnt.

#### 2.5.2 Aktivierung des heparinisierten Vollblutes

- 5 ml Vollblut und 5 ml RPMI-1640 zusammengegeben
- *Unstimulierte Kontrolle:* 2 ml des verdünnten Vollblutes mit 40 µl BFA versetzen  
*Aktivierungskontrolle:* 1 ml des verdünnten Vollblutes mit 10 µl PMA und 20 µl Ionomycin versetzen  
*Stimulierte Probe:* 2 ml des verdünnten Vollblutes mit 40 µl BFA, 20 µl PMA und 40 µl Ionomycin versetzen
- Die Proben vorsichtig mit dem Vortexer mischen und 8 Stunden im Brutschrank bei Dunkelheit und einer Temperatur von 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren.

### 2.5.3 Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Reinigung

Nach der vorgegebenen Inkubationszeit werden die Proben aus dem Brutschrank genommen und jeweils vorsichtig gemischt.

#### Aktivierungskontrolle

- 100 µl aus der Aktivierungskontrolle in ein Falconröhrchen (12x75mm) pipettieren
- mit einer Pipette 10 µl CD69PE und 10 µl CD3PerCP dazupipettieren
- der Ansatz wird vorsichtig gemischt und im Dunkeln bei Raumtemperatur 15 min inkubiert
- 2 ml FACS-Lysing-Solution in das Röhrchen pipettieren
- den Ansatz vorsichtig vortexen und im Dunkeln bei Raumtemperatur 10 min inkubieren
- bei 500 g für 5min zentrifugieren und den Überstand verwerfen
- 500 µl PBS in das Falconröhrchen pipettieren und bis zur Messung im Dunkeln aufbewahren

#### Permeabilisierungskontrolle

- 100 µl unstimuliertes und stimuliertes Blut in jeweils ein Falconröhrchen (12x75mm) pipettieren
- in beide Röhrchen anschließend 2 ml FACS-Lysing-Solution zugegeben
- die Ansätze vorsichtig vortexen und bei Raumtemperatur 10 min im Dunkeln inkubieren
- bei 500 g für 5 min zentrifugiert und den Überstand verwerfen
- jeweils 500 µl FACS-Permeabilizing-Solution in die Röhrchen pipettieren
- vorsichtig vortexen und bei Raumtemperatur 10 min im Dunkeln inkubieren
- 5 min bei 500 g zentrifugieren und den Überstand verwerfen
- zu beiden Ansätzen jeweils 10 µl CD69PE und 10 µl CD3PerCP pipettieren
- vorsichtig vortexen und im Dunkeln bei Raumtemperatur 30 min inkubieren
- 2 ml PBS in beide Röhrchen pipettieren
- die Ansätze bei 500 g für 5 min zentrifugieren und den Überstand verwerfen
- je 500 µl PBS in die Falconröhrchen pipettieren und im Dunkeln bei Raumtemperatur bis zur Messung aufbewahren

## Probanden- und Patientenproben

- 100 µl unstimuliertes und stimuliertes Blut in jeweils 5 Falconröhrchen (12x75mm) pipettieren
- zu jedem der 10 Ansätze jeweils 10µl CD3PerCP pipettieren
- vorsichtig mischen und bei Raumtemperatur im Dunkeln 15 min inkubieren
- jeweils 2 ml FACS-Lysing-Solution zupipettieren
- die Ansätze vorsichtig mischen und bei Raumtemperatur im Dunkeln 10 min inkubieren
- die Röhrchen bei 500 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verwerfen
- 500 µl FACS-Permeabilizing-Solution zu jedem Ansatz pipettieren
- die Ansätze vorsichtig vortexen und bei Raumtemperatur im Dunkeln 10 min inkubieren
- 2 ml PBS in jedes Röhrchen pipettieren
- die Ansätze bei 500 g 5 min zentrifugiert und die Überstände verwerfen
- die unstimulierten und die stimulierten Ansätze werden in jeweils einer Reihe angeordnet und hinzupipettiert werden:
  - 1. unstimuliertes und 1. stimuliertes Röhrchen: 10 µl  $\gamma$ 2aFITC/ $\gamma$ 1PE
  - 2. unstimuliertes und 2. stimuliertes Röhrchen: 0,5 µl IL-1 $\alpha$ PE
  - 3. unstimuliertes und 3. stimuliertes Röhrchen: 10 µl IL-2PE
  - 4. unstimuliertes und 4. stimuliertes Röhrchen: 10 µl IL-8PE
  - 5. unstimuliertes und 5. stimuliertes Röhrchen: 10 µl IL-10PE
- die 10 Röhrchen werden vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur im Dunkeln 30 min inkubiert
- danach wird in jeden Ansatz 2 ml PBS pipettiert
- anschließend werden die Röhrchen 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen
- zum Schluss werden in jedes Falconröhrchen 500 µl PBS pipettiert und die Ansätze im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt

### 2.5.4 Kontrollen zur optimalen Einstellung des Fluoreszenzdurchflusssytometers

- 5 Falconröhrchen werden wie folgt befüllt:
  - 1. Röhrchen: 100 µl Vollblut
  - 2. Röhrchen: 100 µl Vollblut, 10 µl  $\gamma$ 2aFITC/ $\gamma$ 1PE und 10 µl CD3PerCP



3. Röhrchen: 100 µl Vollblut und 10 µl CD3FITC

4. Röhrchen: 100 µl Vollblut und 10 µl CD3PE

5. Röhrchen: 100 µl Vollblut und 10 µl CD3PerCP

- die Ansätze werden vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur im Dunkeln 15 min inkubiert
- anschließend wird in jedes Röhrchen 2 ml FACS-Lysing-Solution pipettiert
- die Ansätze vorsichtig vortexen und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- die Röhrchen bei 500 g 5 min zentrifugieren und die Überstände verwerfen
- 500 µl FACS-Permeabilizing-Solution zu jedem Ansatz pipettieren
- die Ansätze vorsichtig vortexen und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- anschließend 2 ml PBS in jedes Röhrchen pipettieren
- die Ansätze bei 500 g 5 min zentrifugieren und den Überstand verwerfen
- abschließend 500 µl PBS in jedes Falconröhrchen pipettieren und die Ansätze bis zur Messung im Dunkeln aufbewahren

## **2.6 Prinzip und Funktion des Durchflusszytometers**

Bei der Messung mit dem Durchflusszytometer werden große Zellzahlen in kurzer Zeit quantitativ bestimmt und mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten-Antikörpern können bestimmte Eigenschaften dieser Zellen (z.B. Produktion bestimmter Proteine) auf Einzelzellebene dokumentiert werden.

In unserer Studie wurde der prozentuale Anteil an T-Lymphozyten bestimmt, welche die Zytokine IL-1, IL-2, IL-8 und IL-10 produziert haben. Die Messung erfolgte am Zytometer FACSCalibur der Firma Becton & Dickinson, welches mit einem Macintosh Quadra 650®-Computer der Firma Apple verbunden ist. Die Messungen wurden auf Disketten abgespeichert. Das Akronym FACS bedeutet `fluorescent activated cell sorter` und steht für ein Verfahren zur Bestimmung von Zellen mit bestimmten Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, die vorher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden.

Zur Messung wird eine Metallkapillare in ein spezielles Messröhrchen (Falconröhrchen) eingebracht, in dem die Zellen in einer Einzelzellsuspension mit einer Konzentration von 0,5 bis 20 Millionen Zellen pro Milliliter vorliegen. Mit der Erfüllung dieser Voraussetzung, dem Vorliegen in einer Einzelzellsuspension, ist prinzipiell jede Art von Zelle geeignet durchflusszytometrisch untersucht zu werden.

In dem Falconröhrchen wird ein Überdruck erzeugt, wodurch die Zellsuspension über die Metallkapillare in die Messkammer gelangen. Beim Eintritt in die Messkammer werden die Zellen in der Suspension mit einer zugeführten partikelfreien Trägerflüssigkeit (sheath fluid) beschleunigt und wie in einer Perlenkette einzeln hintereinandergereiht. Das geschieht dadurch, dass die Probenflüssigkeit durch verschiedene Küvetten mit abnehmendem Durchmesser geleitet wird. Dabei vermindert sich der Probenstromdurchmesser von anfangs 200  $\mu\text{m}$  auf etwa 10  $\mu\text{m}$  am Messpunkt und die Flussgeschwindigkeit nimmt von wenigen Zentimetern/Sekunde auf etwa sieben Meter/Sekunde zu. Dieser Vorgang wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet.

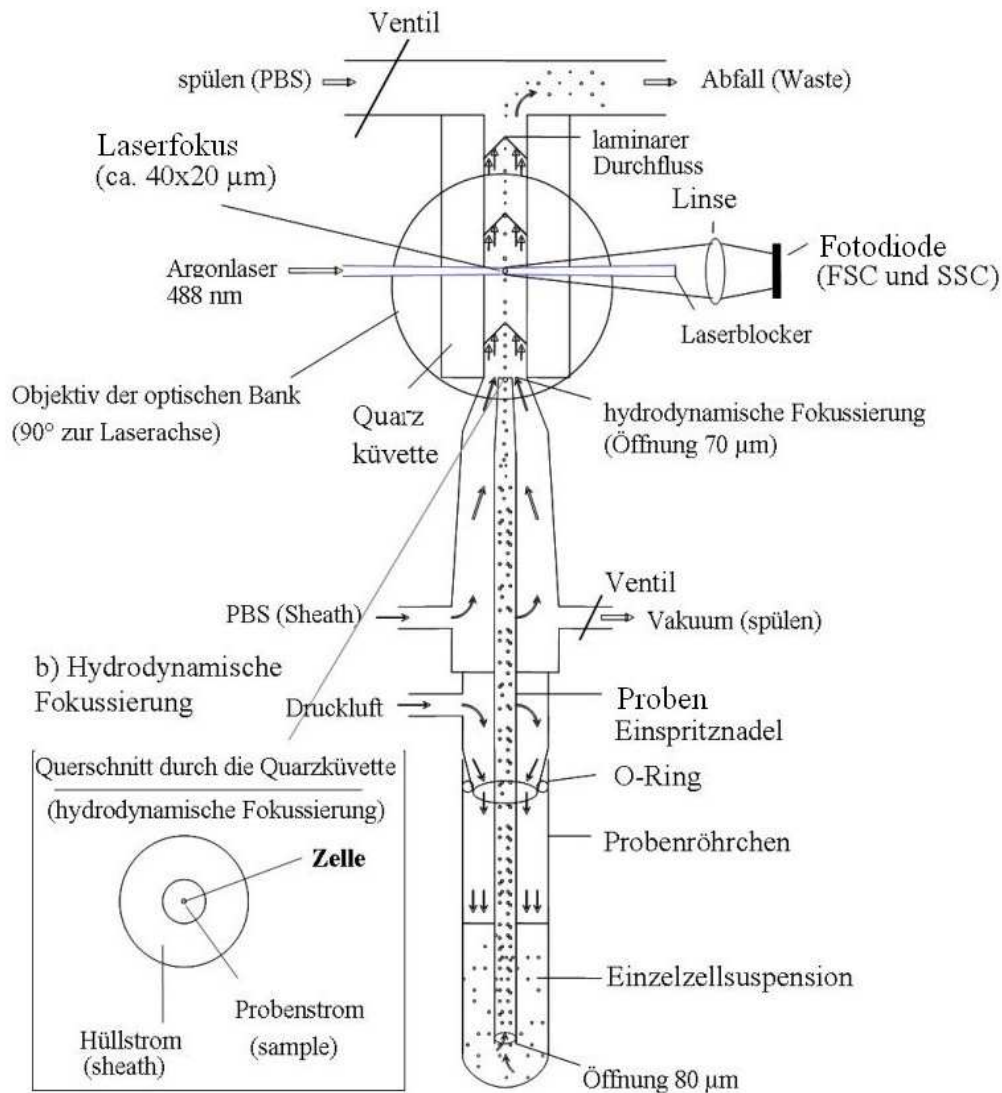
Die Zellsuspension wird anschließend durch einen Laserstrahl geeigneter Wellenlänge geleitet. Der FACSCalibur arbeitet, wie in der analytischen Durchflusszytometrie typisch, mit einem Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Durchdringt eine Zelle den Laserstrahl, so wird das Licht in verschiedene Richtungen abgelenkt und gibt so Information über die Beschaffenheit der Zelle. Eine Photodiode misst bei jeder Zelle, die den Lichtstrahl durchbricht eine Verminderung des normalerweise mit gleicher Intensität auftreffenden Lichtstrahls und vermerkt dies als 'Event'. Jede gemessene Zelle stellt also ein Event dar.

Das Streulicht verläuft nicht in alle Richtungen gleich und wird mit verschiedenen Photodioden aufgefangen und gemessen. Somit werden verschiedene Information über die Zelle ermittelt:

In kleinem Winkel ( $0,5-5^\circ$ ) vorwärts gestreutes Licht (ForwardScatter, FSC), in Richtung des einfallenden Lichtstrahls, verhält sich zur Zellgröße proportional.

Das in großen Winkeln ( $15-150^\circ$ ) abgelenkte Seitstreulicht (SideScatter, SSC) gibt Auskunft über die inneren Strukturen der Zelle, die Granularität.

Durch das FACSCalibur können aber außer den beiden eben genannten Kriterien der Lichtstreuung, die Auskunft über die Morphologie der Zelle geben, auch noch andere Parameter, wie beispielsweise intrazelluläre Proteine oder Oberflächenmoleküle mit Hilfe der fluoreszierenden Farbstoffe bestimmt werden.



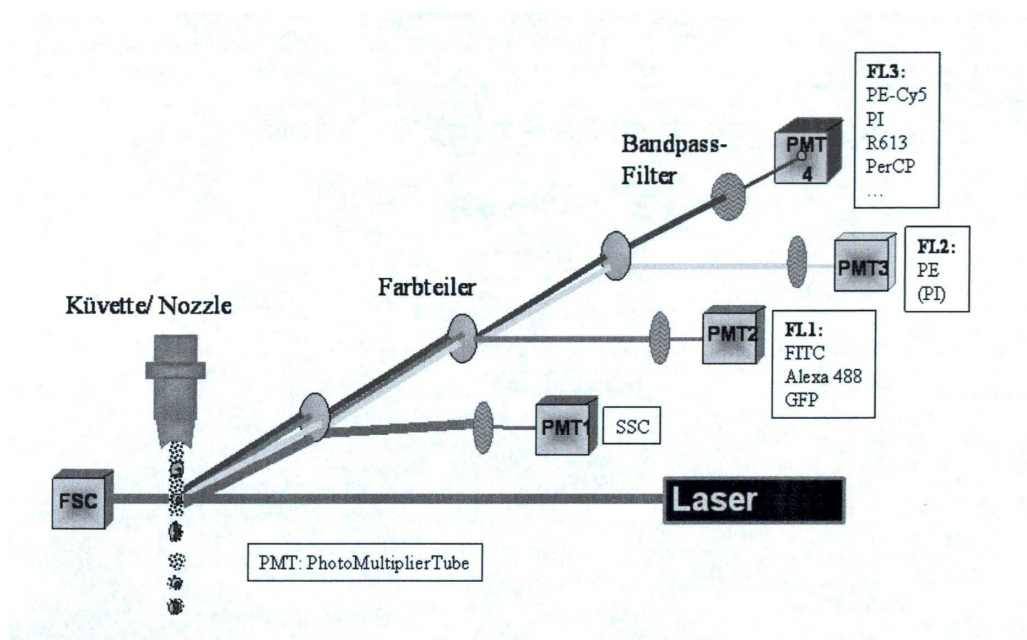
**Abbildung 1: Aufbau des Durchflusszytometers**

Trifft das monochromatische Laserlicht mit einer Wellenlänge von 488 nm auf eine fluoreszenzmarkierte Zelle, so werden Elektronen des Farbstoffes auf ein höheres energetisches Niveau gehoben und fallen nach der Passage des Laserstrahles auf ihr Ursprungsniveau unter Abgabe von Energie zurück. Die abgegebene Energie in Form von Photonen wird mit Photodetektoren registriert. Es unterscheidet sich von dem Streulicht des Lasers eindeutig, da jeder Fluoreszenzfarbstoff ein für sich typisches Emmissionsspektrum besitzt, welches sich jeweils von den anderen gemessenen Wellenlängen unterscheidet. Damit ist eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse möglich, die das Anwendungsspektrum der Durchflusszytometrie erheblich erweitert. In dieser Studie wurden 3 verschiedene Farbstoffe verwendet, deren Absorptionsmaxima nahezu der Wellenlänge des verwendeten Argonlasers von 488 nm entsprechen, was eine unmittelbare Bedingung für eine optimale Messvoraussetzung bedeutet.

**Tabelle 2: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Farbstoffe**

Fluorochrom	Absorptionmax. (nm)	Emissionsmax. (nm)
Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)	495	519
Peridin Chlorophyll Protein (PerCP)	490	675
Phycoerythrin (PE)	480; 565	578

Des weiteren erhält man außer Größe und Granularität noch weitere Informationen über die Zelle, indem das emittierte Licht der Fluoreszenzfarbstoffe mit speziellen Detektoren erfasst wird. Zusammen mit dem Streulicht wird es in elektrische Signale umgewandelt und am Analysecomputer sichtbar gemacht.



**Abbildung 2: Schema der Funktion des Lasers**

## 2.7 Prinzip der Auswertung

### 2.7.1 Prinzip der Bestimmung der T-Zellen

Die vom Zytometer gemessenen Zellen werden in ein Punkthistogramm (Dot Plot) eingetragen, wobei jeder Punkt eine Zelle darstellt. Auf der Ordinate ist der sidescatter (SSC), also die gemessene Granularität der Zellen eingetragen. Auf der Abszisse ist der forwardscatter (FSC), also die gemessene Größe der Zellen, aufgetragen. Die Darstellung der Leukozyten erfolgt in Form von 'Wolken' die in ihren Gruppen dargestellt sind, Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten. Die Erythrozyten sind in diesem Messschritt nicht mehr vorhanden, da sie in der

vorausgegangenem Aufarbeitung der Proben bereits lysiert und herausgewaschen wurden und damit bei der Messung im Zytometer nicht mehr vorlagen.

Um in weiteren Schritten nur noch die Lymphozyten zu berücksichtigen, werden diese mit einer speziellen Markierung versehen, dem sogenannten Gate. Monozyten und Granulozyten fallen damit in den folgenden Schritten aus der Analyse heraus.

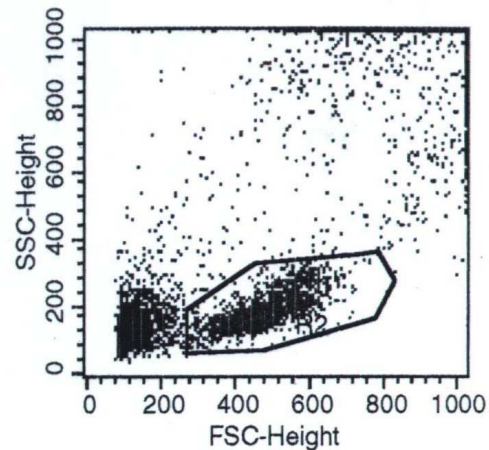


Abbildung 3: Bestimmung der Lymphozyten

Von den verbleibenden Lymphozyten sollen die T-Zellen als einzige in dieser Studie weiter betrachtet werden. Um diese in der Analyse eindeutig identifizieren zu können, wurde der Probe bei der Aufarbeitung der Fluoreszenzfarbstoff PerCP, gebunden an CD3-Antikörper, zupipettiert. Diese Antikörper binden an die CD3-Oberflächenmoleküle der T-Zellen. Da ausschließlich die T-Zellen diese Oberflächenmoleküle tragen, sind sie in der Analyse des Zytometers eindeutig über den Farbstoff PerCP von den anderen Lymphozyten zu unterscheiden. In dem folgenden Dot Plot ist auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität für PerCP dargestellt und auf der Ordinate der sidescatter (SSC). Die PerCP-positiven

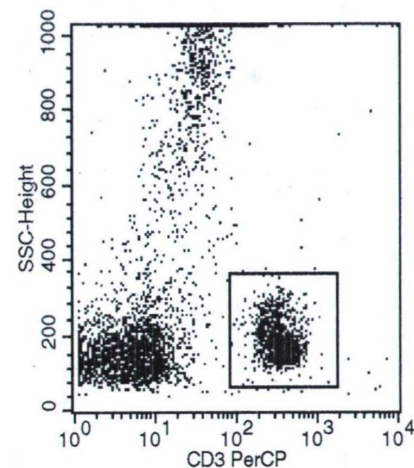


Abbildung 4: Best. der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind in einer Punktwolke von den B-Lymphozyten eindeutig zu unterscheiden und werden mit einem Gate markiert. Damit fallen auch die B-Lymphozyten aus der weiteren Analyse heraus und es können ausschließlich Informationen über die T-Zellen ausgewertet werden.

### 2.7.2 Isotypenkontrolle

Die eingesetzten Isotypenkontrollen werden benutzt, um unspezifische Fluoreszenzfärbungen, die durch die in dieser Studie eingesetzten monoklonalen Mausantikörper vorkommen können, zu unterdrücken. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, werden spezielle Zellproben als Isotypenkontrollen eingesetzt. Ihnen wird in der Aufbereitung der Proben ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt, der nicht an Antikörper gebunden vorliegt, die für die Zellpräparation von Interesse ist. Wir haben als Isotypenkontrolle  $\gamma$ 2aFITC/ $\gamma$ 1PE verwendet. Es

handelt sich dabei um monoklonale Antikörper, die mit genau definierten Fluoreszenzfarbstoffen beladen sind. Das Emissionsmaximum des grünen Fluoreszenzfarbstoffes FITC liegt bei 519 nm. PE ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff mit einem Emissionsmaximum von 578 nm. Die Analyse der beiden Farbstoffe verläuft nach dem gleichen Schema. Da in dieser Studie vorwiegend mit dem Farbstoff PE gearbeitet wurde, wird die Analyse nur anhand dieser Fluoreszenz erläutert.

Im Dot Plot ist die Fluoreszenzintensität für CD3PerCD auf der Abszisse und für  $\gamma$ 1PE auf der Ordinate aufgetragen. Die dargestellten T-Lymphozyten wurden über CD3PerCP eindeutig identifiziert und sind zusätzlich mit  $\gamma$ 1PE markiert. Ist diese Zellpopulation als dichte Zellwolke im Messfeld zu sehen, so ist der Fluoreszenzkanal für die rote Fluoreszenz, in unserem Fall PE, optimal eingestellt und diese Messung wird als Standard genommen, an dem sich alle Proben anlehnen.

### 2.7.3 Aktivierungskontrolle

Nachdem die Fluoreszenzfarbstoffe überprüft wurden, muss nun noch eine Kontrolle erfolgen, ob die Proben auch wirklich korrekt stimuliert wurden. Dazu wird bei der Aktivierungskontrolle mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen den Zellmembranrezeptor CD69 geprüft, ob dieser an der Zelloberfläche der T-Zellen exprimiert wurde. Dieser Rezeptor ist nur bei stimulierten T-Lymphozyten nachzuweisen, befindet sich also bei ruhenden T-Zellen nicht an deren Oberflächen. Als

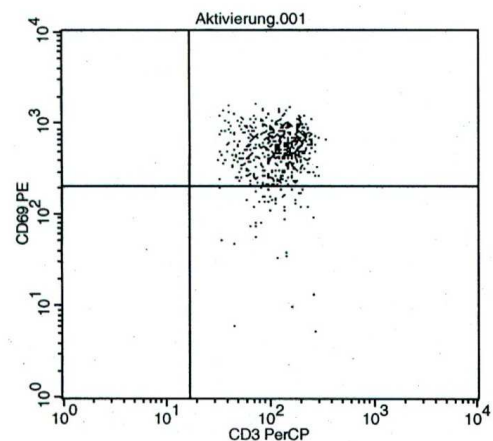


Abbildung 5: Aktivierungskontrolle

Fluoreszenzfarbstoff ist PE an den Antikörper gebunden. Die Aktivierungskontrolle wird in der Phase der Aufarbeitung genauso wie die anderen Proben mit PMA und Ionomycin stimuliert, jedoch wird kein BFA zugeführt. BFA bindet als Proteininhibitor neu synthetisierte Proteine an den Golgiapparat und würde somit auch verhindern, dass die neu synthetisierten CD69-Rezeptoren von stimulierten T-Zellen an deren Oberfläche exprimiert werden können.

Im Dot Plot ist auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität von CD3PerCP aufgetragen zur eindeutigen Erkennung der T-Lymphozyten und auf der Ordinate die Fluoreszenzintensität von CD69PE. Sind in der Analyse der Aktivierungskontrolle mehr als 90% der gemessenen T-Zellen CD69-positiv, so ist die Stimulierung geglückt.

#### *2.7.4 Permeabilitätskontrolle*

Die Permeabilitätskontrolle dient der Kontrolle, ob das Einbringen von Löchern in die T-Zellen mit der Permeabilisierungslösung korrekt durchgeführt wurde.

Die Kontrollprobe wird in der Aufarbeitungshase mit der gleichen Menge an PMA und Ionomycin stimuliert wie die eigentlichen Proben auch und erhält ebenfalls BFA. In den aktivierten T-Zellen wird nun unter anderem der CD69-Rezeptor produziert, der aber nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden kann, da er durch BFA an den Golgiapparat gebunden vorliegt. Der Permeabilitätskontrolle wird gleichzeitig mit den Proben in einem späteren Aufarbeitungsschritt Permeabilisierungslösung zugeführt, die Löcher in die Membranen der Zellen reißt. Durch diese Membrandefekte können nun CD69PE-Fluoreszenzantikörper in die Zelle eindringen und die CD69-Rezeptoren am Golgiapparat markieren.

Im Dot Plot ist auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität für CD3PerCP und auf der Ordinate für CD69PE aufgetragen. Sind mehr als 90% der T-Zellen CD69-positiv, so sind die Proben korrekt permeabilisiert worden.

#### *2.7.5 Die zu untersuchenden Proben*

Sind alle Kontrollen zur Testung der eingesetzten Reagenzien positiv, so folgt die eigentliche Proben testung. Auf der Abszisse des Dot Plots der gemessenen Proben ist, wie bei den Kontrollen auch, die Fluoreszenzintensität für CD3PerCP dargestellt. Auf der Ordinate ist für jede Probe speziell die Fluoreszenzintensität des PE-gebundenen-Zytokinantikörpers aufgetragen, mit dem die Probe markiert wurde. Jedem Patienten werden mehrere Dot Plots von stimulierten Proben zugeordnet, mit denen der prozentuale Anteil an T-Lymphozyten bestimmt werden soll, die jeweils ein bestimmtes Zytokin produziert haben.

### **2.8 Computereinstellungen und Messung der Proben**

Die Analyse des prozentualen Anteils der gemessenen T-Lymphozyten, die die Zytokine IL-1, IL-2, IL-8 und IL-10 produziert haben erfolgte an einem Macintosh Quadra 650<sup>®</sup> der Firma Apple. Die für diese Studie verwendete Analysesoftware mit dem Namen CellQuest<sup>™</sup> stammt von der Firma Becton & Dickinson. Von jeder zu analysierenden Probe wurden 5000 T-Lymphozyten ausgewertet.

#### *2.8.1 Allgemeine Computereinstellungen*

Bevor die Messungen und Analysen der Proben und Kontrollen beginnen können, müssen dafür noch Vorbereitungen am Computer getroffen werden.

1. Zu Beginn der Messungen wird als erstes, nachdem der Computer angeschaltet wurde, das Analyseprogramm *CellQuest* gestartet.
2. Es wird die Darstellungsgrafik Dot Plot ausgewählt, woraufhin in dem geöffneten Fenster 5 Dot Plots erscheinen. Diese sind wie folgt definiert:

Im ersten Dot Plot werden die Lymphozyten von den anderen gemessenen Zellen mit einem Gate markiert, wodurch die anderen Zellen in der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt werden (siehe 2.6.1.).

Im zweiten Dot Plot wird die Wolke der T-Lymphozyten markiert, wodurch nur noch diese in der weiteren Analyse berücksichtigt werden (siehe 2.6.1.).

Die Dot Plots 3-5 werden in den verschiedenen Messungen der Kontrollen und Proben mit unterschiedlichen Markern zur Bestimmung der intrazellulär gebundenen Fluoreszenzantikörper versehen und teilen sich in 4 Quadranten ein.

**Tabelle 3: Einstellung der Dot Plots**

	Abszisse	Ordinate
1. Dot Plot	FSC	SSC
2. Dot Plot	FL3	SSC
3. Dot Plot	FL1	FL2
4. Dot Plot	FL1	FL3
5. Dot Plot	FL2	FL3

3. In der Menüleiste wird das Feld *Aquire* geöffnet und über den Befehl *Connect to Cytometer* der Computer mit dem Zytometer verbunden.
4. Wieder über *Aquire* geht man auf das Unterfeld *Parameter Description*. Hier wird das Speichermedium und der Dateiname bestimmt.
5. Damit die Detektoren des Lasers, die das Lichtsignal in elektronische Signale umwandeln, mittels der Software bezüglich Stromstärke und Spannung optimal für diese Messung eingestellt sind, muss folgender Schritt durchgeführt werden: In der Menüleiste über das Feld *Cytometer* das Unterfeld *Detectors/Amps* auswählen und dort die Parameter aus folgender Tabelle einstellen:



**Tabelle 4: Einstellung der Detektoren des Lasers**

Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
<b>P1</b>	FCS	E00	2.63	Lin
<b>P2</b>	SSC	534	1.00	Lin
<b>P3</b>	FL1	831	1.00	Log
<b>P4</b>	FL2	818	1.00	Log
<b>P5</b>	FL3	821	1.00	Log

6. Über *Cytometer* in der Menüleiste wird das Unterfeld *Threshold* ausgewählt und der Thresholdwert 52 eingegeben. Mit dieser Angabe wird der untere Schwellenwert für die FSC-Datenerkennung festgelegt, der dazu dient, Störfaktoren wie Zelltrümmer, die einen kleineren Thresholdwert haben als angegeben, aus der Event-Erkennung fernzuhalten.
7. Wieder über *Cytometer* wird das Feld *Compensation* geöffnet. Bei zwei oder drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen in einer Messung kann es bei überschneidenden Wellenlängenspektren zu Verstärkungen der Signale in diesen Bereichen kommen, was zu falsch positiven Ergebnissen führt. Zur Korrektur werden die Überschneidungen einfach von einander abgezogen. Die Werte dafür werden in diesem Fenster eingegeben und betragen für unseren Versuchsaufbau:

FL1- 1,0% FL2  
 FL2- 21,6% FL1  
 FL2- 0,0% FL3  
 FL3- 23,8% FL2

### 2.8.2 Geräteeinstellung

Nachdem die allgemeinen Computereinstellungen durchgeführt wurden, beginnt die Auswertung der Proben und Kontrollen mit der Geräteeinstellung.

1. Über *Aquire* in der Menüleiste wird das Fenster *Edit Panel* angeklickt. Da die fünf Proben für die Geräteeinstellung immer in gleicher Reihenfolge gemessen werden, wird hier ein festes Messschema eingegeben und abgespeichert, das für die nachfolgenden Messungen einfach wieder aufgerufen werden kann.

**Tabelle 5: Computereinstellung zur Messung der Geräteeinstellung**

	<b>Name der Probe</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>
<b>1. Röhrchen</b>	ohne Fluoreszenz	FSC	SSC			
<b>2. Röhrchen</b>	Isotypenkontrolle	FSC	SSC	IgGγ2aFITC	IgGγ2aPE	CD3 PerCP
<b>3. Röhrchen</b>	CD3 FITC	FSC	SSC	CD3 FITC	CD3 PE	CD3 PerCP
<b>4. Röhrchen</b>	CD3 PE	FSC	SSC	CD3 FITC	CD3 PE	CD3 PerCP
<b>5. Röhrchen</b>	CD3PerCP	FSC	SSC	CD3 FITC	CD3 PE	CD3 PerCP

- Das erste Falconröhrchen wird nun unter den Ansaugstutzen gesetzt und die Messung gestartet. Dieser Probe wurde kein Fluoreszenzfarbstoff zugegeben und ist entsprechend auch nur im ersten Dot Plot zu bewerten, nämlich nach SSC und FSC. In der Grafik erscheinen die Wolken der verschiedenen Leukozytengruppen. Um die Punktwolke der Lymphozyten wird das Gate gesetzt und somit die anderen Zellgruppen aus der weiteren Bewertung ausgeschlossen.

Danach wird das Ergebnis abgespeichert.

- Ist die erste Messung abgeschlossen, wird das Röhrchen mit der Isotypenkontrolle zur Messung in die Vorrichtung eingesetzt. Als zweite Probe wird sie entsprechend im zweiten Dot Plot dargestellt und dient der Verhinderung von Streufluoreszenzen von Seiten der eingesetzten Antikörper.
- Im Anschluss werden nacheinander die drei Proben in den Falconröhrchen drei bis fünf gemessen, denen jeweils ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt wurde. Sie finden entsprechend in den Dot Plots 3 bis 5 Darstellung und dienen der Optimierung der Einstellung der Fluoreszenzkanäle.

### 2.8.3 Aktivierungskontrolle

- Vor der ersten Messung muss auch für die Aktivierungskontrolle, genau wie für die Geräteeinstellung ein Messschema erstellt werden. In der Menüleiste wird wieder über das Feld Acquire das Unterfeld Edit Panel geöffnet und folgende Parameter eingegeben:

**Tabelle 6: Computereinstellung zur Messung der Aktivierungskontrolle**

	<b>Name der Probe</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>
<b>1.Röhrchen</b>	Aktivierungskontrolle	FSC	SSC	FL1	CD69PE	CD3PerCP

- Danach kann die Kontrollprobe gemessen und abgespeichert werden.

#### 2.8.4 Permeabilitätskontrolle

1. Für die Permeabilitätskontrolle muss ebenfalls vor der ersten Messung ein Panel erstellt werden über *Edit Panel*.
2. Anschließend können die beiden Kontrollen nacheinander gemessen und gespeichert werden.

**Tabelle 7: Computereinstellung zur Messung der Permeabilitätskontrolle**

	Probenname	P1	P2	P3	P4	P5
<b>1.Röhrchen</b>	Unstimulierte Permkontrolle	FSC	SSC	FL1	CD69PE	CD3PerCP
<b>2.Röhrchen</b>	Stimulierte Permkontrolle	FSC	SSC	FL1	CD69PE	CD3PerCP

#### 2.8.5 Messung der Proben

1. Auch vor der Probenmessung muss ein Panel über *Edit Panel* erstellt werden.
2. Nun folgt für jede Probe einzeln die Messung und das Abspeichern.

**Tabelle 8: Computereinstellung zur Messung der Proben**

	Probenname	P1	P2	P3	P4	P5
<b>1.Röhrchen</b>	Isotypenkontrolle	FSC	SSC	IgGγ2aFITC	IgGγ2aPE	CD3PerCD
<b>2.Röhrchen</b>	IL-1	FSC	SSC		IL-1αPE	CD3PerCD
<b>3.Röhrchen</b>	IL-2	FSC	SSC		IL-2PE	CD3PerCD
<b>4.Röhrchen</b>	IL-8	FSC	SSC		IL-8PE	CD3PerCD
<b>5.Röhrchen</b>	IL-10	FSC	SSC		IL-10PE	CD3PerCD

### 2.9 Analyse der gewonnenen Daten

Nachdem alle Proben mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen und abgespeichert wurden, wird die Analyse der gewonnen Daten durchgeführt. Es wird dazu wie bei der Datenmessung das Computerprogramm CellQuest™ von Becton & Dickinson verwendet. Nachdem der Analysebereich des Programmes geöffnet wurde, erscheint das Analysefenster mit vier Dot Plots.

Um die erste gespeicherte Messung in das Analyseprogramm zu übertragen, geht man in der Menüleiste über *Edit* und dann über das Unterverzeichnis auf *Select All*, um alle drei Dot Plot zu markieren und öffnet dann in der Menüleiste über *Plots* das Unterverzeichnis *Change Data File*. Auf diesen Befehl öffnet sich ein Fenster, aus dem man auswählen kann, welche

gespeicherte Messung eingelesen werden soll. Die Messungen werden in folgender Reihenfolge einzeln aufgerufen und analysiert:

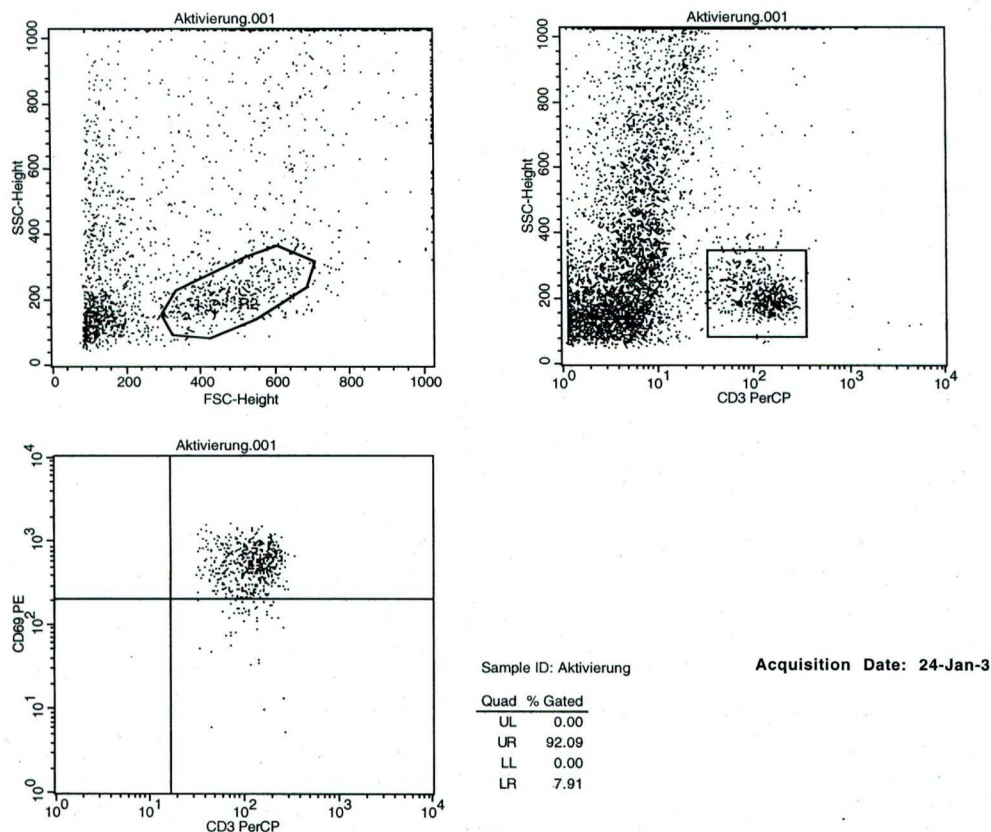
- a. Aktivierungskontrolle
- b. Permeabilitätskontrolle      → unstimuliert  
   → stimuliert
- c. Probenmessung                → Isotypenkontrolle  
   → IL-1 $\alpha$   
   → IL-2  
   → IL-8  
   → IL-10

Die aufgerufene Probe erscheint in den drei Punkthistogrammen. Im ersten Feld ist auf der Abszisse der ForwardScatter (FSC) und auf der Ordinate der SideScatter aufgetragen. Hier ist abermals die Lymphozytenwolke gegen die anderen Leukozyten mit einem Gate abzugrenzen. Wie unter 2.6.1. bereits erläutert, werden durch das Gaten die anderen Leukozyten in die weitere Analyse nicht mit eingezogen.

Im zweiten Dot Plot ist die Fluoreszenzintensität von CD3PerCP auf der Abszisse gegen den SSC aufgetragen. Hier sind mit einem Gate die CD3-positiven T-Lymphozyten zu versehen. Damit entfallen die CD3-negativen Lymphozyten aus der weiteren Analyse (siehe 2.6.1.).

Im dritten Punkthistogramm ist auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität von CD3PerCP gegen die Fluoreszenzintensität des für jede Messung speziellen PE-gebundenen-Antikörper (im Beispiel für die Aktivierungskontrolle CD69PE) auf der Ordinate aufgetragen. Dieses Dot Plot ist durch ein verschiebbares Kreuz in vier Quadranten unterteilt:

- UL- Upper Left (oben links)
- UR- Upper Right (oben rechts)
- LL- Lower Left (unten links)
- LR- Lower Right (unten rechts)



**Abbildung 6: Analyse der gemessenen Proben**

In der linken Feldhälfte werden CD3PerCP-negative Zellen von CD3PerCP-positiven Zellen in der rechten Feldhälfte getrennt. Durch die Vorselektion in den davor abgehaltenen Mess- und Analyseschritten sollten sich in der linken Feldhälfte keine Zellenpunkte, also keine CD3-negativen Zellen, mehr befinden.

Durch die horizontale Linie werden in der oberen Hälfte die Zellen dargestellt, an die der jeweils für die Probe spezielle PE-markierte-Antikörper gebunden hat (im Beispiel der Aktivierungskontrolle von CD69PE). In der unteren Feldhälfte befinden sich entsprechend die Zellen, die negativ für diesen Antikörper sind. Das verschiebbliche Kreuz sollte so an die jeweilige Zellwolke angepasst werden, dass die beiden Linien als optimal eingestellter Grenzwert für negative und positive Zellen zu bewerten sind.

Bei der Aktivierungskontrolle sollten sich 90% CD69PE-positive Zellen im Bereich UR befinden, damit die Messreihe als korrekt stimuliert gewertet werden kann (3.5.4.).

Für die stimulierte Permeabilitätskontrolle sollten sich ebenfalls mindestens 90% CD69PE-positive Zellen im Bereich UR befinden (3.5.5.).

In der Analyse der Proben stellt der UR-Wert den prozentualen Anteil an T-Lymphozyten dar, die das in der Messung markierte Zytokin produziert haben. Dieser Wert bildet das Endergebnis jeder einzelnen Probenmessung und wird sorgfältig notiert.

## **2.10 Bestimmung von Glutamin mittels hochauflösender Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC)**

Die Bestimmung von Glutamin im Plasma erfolgte mit hochauflösender Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC). Dafür wurden die Plasmaproben lyophilisiert (Gefriertrocknung unter Hochvakuum bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , CIT-2<sup>®</sup>, Heraeus, Hanau). Die Lyophilisierung ermöglicht die längerfristige Lagerfähigkeit der Proben bis zur Derivatisierung.

### *2.10.1 Automatisierte Vorsäulen-Derivatisierung*

Die lyophilisierten Proben wurden vor der Vorsäulenderivatisierung manuell durch Aufpipettieren von 280  $\mu\text{l}$  Standardextraktionspuffer gelöst und in einen methanolischen Extrakt überführt. Der Standardextraktionspuffer besteht aus einem Gemisch von 80% „Methanol für die HPLC“ und 20% „H<sub>2</sub>O für die HPLC“ (beide Merck, Darmstadt), der zusätzlich zur internen Standardisierung der Analytik das in physiologischen Aminosäurengemischen nicht vorkommende Homoserin (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 4  $\mu\text{g/ml}$  beinhaltet. Darüber hinaus gewährleistet der Standardextraktionspuffer die kurzfristige Lagerungsfähigkeit der resuspendierten Aminosäurenlyophilisate im Rahmen der sich anschließenden automatisierten Vorsäulen-Derivatisierung. Nach der Zentrifugation (Rotixa/KS<sup>®</sup>, Tuttlingen) wurden 200  $\mu\text{l}$  des Extrakts in ein spezielles Probengefäß gebracht (2-CRV<sup>®</sup> Chromacoll, Trumbull, USA) und anschließend automatisiert mit 0,5 M Boratpuffer auf einen pH=9,5 basisch gepuffert. Danach wird O-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA-Thiol-Reagenz) zur Fluoreszenzmarkierung der Aminosäuren zugesetzt. Die Derivatisierung wurde nach exakt 120 Sekunden durch Neutralisierung mittels 0,75 N HCl gestoppt, um die Stabilität der im alkalischen Medium Fluoreszenz-markierten Aminosäuren zu gewährleisten und die Stabilität des Säulenmaterials zu schonen. Dieser Ansatz wurde weiterhin mit dem Elutionspuffer A 1:4 verdünnt und 50  $\mu\text{l}$  dieser Lösung in das System injiziert.

### *2.10.2 Gradientenelution*

Nach sorgfältiger Äquilibration der Analytik über mehr als vier Stunden erfolgte die Gradientenelution. Zur Verwendung kam ein binäres Eluentensystem mit Methanol-Acetat (0,05 M)-Puffern. Die Elutionspuffer wurden mit einer Flussrate nach den in Tabelle 2 beschriebenen Mischungsverhältnissen in das F-HPLC-System eingespeist. Die von der Gradientenpumpe erzeugte Flussrate beträgt 1  $\text{ml} \times \text{min}^{-1}$ . Der aufgrund dieser Flussrate im

System entstehende Arbeitsdruck betrug je nach Puffer-Mischungsverhältnis zwischen 2900 und 3500 PSI. Die zur Fluoreszenzdetektion der Aminosäuren verwendete Anregungswellenlänge lag bei 330 nm, die Emissionswellenlänge bei 450 nm.

**Tabelle 9: Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse von Glutamin.**

Gradientenzeitverläufe		
Zeit (min)	Puffer A	Puffer B
0	97	3
3	97	3
3,1	100	0
37	70	30
63	0	100
67	97	3
Puffer A: 19% Methanol / 81% 0,05 M Acetat, pH 7,2		
Puffer B: 75% Methanol / 25% 0,05 M Acetat, pH 7,2		
Flussrate: 1 ml/min		
Druck: 2900 PSI + 150 PSI (A: 97%/B: 3%)		
Fluoreszenzdetektion:		
Anregungswellenlänge: 330 nm, Emissionswellenlänge: 450 nm		

Zur Verwendung kommen zwei vorgemischte Methanol-Acetatpuffer I PSI = 6894,76°Pa.

### 2.10.3 Qualitätskontrolle bei der Bestimmung von plasmatischem Glutamin mittels F-HPLC

Um die Reproduzierbarkeit und die Qualität der Messergebnisse im Rahmen der F-HPLC Quantifizierung der Aminosäuren konstant gewährleisten zu können, wurde die Analytik kontinuierlich mittels externen sowie internen Standardisierungsverfahren überwacht.

Die Variationskoeffizienten für die Reproduzierbarkeit der Methodik (Variationskoeffizienten der Flächen) betragen bei Reihenanalysen von Standardaminosäurenproben im Durchschnitt zwischen 0,86% und 2,34% sowie bei „Tag-zu-Tag“-Analysen zwischen 1,88% und 4,69%. Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten bei Reihenanalysen liegt im Mittel zwischen 0,02% und 0,23% und bei „Tag-zu-Tag“-Analysen zwischen 0,04% und 0,72%. Wie die Ergebnisse der Reihen- aber auch der „Tag-zu-Tag“-Untersuchungen zeigen, gewährleistet der verwendete Standardextraktionspuffer (80%/20% Methanol-H<sub>2</sub>O-Gemisch) die kurzfristige Lagerfähigkeit, so dass es auch nach Resuspendierung der lyophilisierten Standardaminosäurenproben zu keiner weiteren chemischen Umwandlung beziehungsweise zum Verlust an Fluoreszenzaktivität kommt. Die Wiederfindungsrate betrug sowohl bei den

Aminosäurenstandardproben wie bei den Plasmaproben für die untersuchten Aminosäuren 100%.

## **2.11 Statistik**

Damit die Null-Hypothese für beide Hauptzielparameter, die IL-2-Produktion am ersten postoperativen Tag und die Infektionsrate, abgelehnt werden kann, muss der Stichprobenumfang das Maximum der Schätzung für die beiden Parameter betragen. Zur Schätzung des Stichprobenumfangs wird von folgenden Gegebenheiten ausgegangen:

Für die IL-2-Produktion gingen wir bei einem Mittelwert von 45% der Fluoreszenzintensität von einer relevanten Differenz von 9% aus. Bei einer beobachteten Standardabweichung der Synthese von 10%, einem  $\alpha$  von 0,05 und einer Power von 0,8 ergibt sich ein Stichprobenumfang von  $n=20$  pro Gruppe (5,16).

Die deskriptive Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch das arithmetische Mittel und die Standardabweichung. Als weitere Lage- und Streuungsmaße wurden der Median (50%-Quartil) und die Terzile bestimmt. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft (19).

Vergleiche zwischen der Glutamin-, Aminosäuren- und Kontrollgruppe wurden mit einer Varianzanalyse und dem Scheffé-Test als multiplem Anschlussstest beziehungsweise dem  $\chi^2$ -Test untersucht. Fragestellungen zum zeitlichen Verlauf wurden mit einer Varianzanalyse für Messwiederholungen („repeated measures analysis“) analysiert (84). Im Anschluss wurden multiple Vergleiche zum vorhergehenden Messzeitpunkt durchgeführt. Das Signifikanzniveau, das auf 0,05 festgelegt wurde, wurde dabei nach Bonferroni korrigiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows Version 11.0.1. im Statistikbüro MoreData, Gießen.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Grunddaten

An dieser Studie nahmen insgesamt 79 Patienten teil, die den folgenden drei Gruppen zugeordnet wurden:

Gruppe 1: glutaminhaltige Dipeptaminlösung (n = 31)

Gruppe 2: glutaminfreie Aminosäurelösung (n = 27)

Gruppe 3: aminosäurefreie NaCl-Lösung (n = 21)

Im Folgenden werden die Grunddaten der Patienten tabellarisch dargestellt.

##### 3.1.1 Patientencharakteristika nach Gruppen

**Tabelle 10: Patientencharakteristika nach Untersuchungsgruppen**

Patientencharakteristika		Glutamin n=31	Aminosäuren n=27	Kontrolle n=21	p-Wert
Patientenalter [Jahre]		71,3 ± 7,4	68,3 ± 9,3	68,7 ± 7,6	p = 0,323
Geschlecht	männlich	21	15	17	p = 0,488
	weiblich	10	12	4	p = 0,509
Body mass Index [kg/m <sup>2</sup> ]		26,4 ± 3,2	26,2 ± 3,5	27,1 ± 4,3	p = 0,676
ASA		3,1 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,2	p = 0,101
EF [%]		57,4 ± 11,8	59,5 ± 11,6	53,4 ± 17,3	p = 0,295
LVEDP [mm Hg]		17,6 ± 10,2	16,6 ± 7,8	12,6 ± 8,2	p = 0,132
Anzahl präoperativer Myokardinfakte pro Patient		0,32 ± 0,48	0,33 ± 0,55	0,33 ± 0,48	p = 0,999

ASA (Score der American Society of Anesthesiologists),

EF (Ejektionsfraktion), LVEDP (Linksventrikulärer enddiastolischer Druck)

In der Tabelle 10 ist der Durchschnitt der allgemeinen Daten (Alter, Geschlecht, BMI, ASA, EF, LVEDP, Anzahl der präoperativen Infarkte) der Studienpatienten mit dazugehöriger Standardabweichung, nach Gruppenzugehörigkeit getrennt, angegeben. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen Glutamin, Aminosäuren und Kontrolle.

### 3.1.2 Patientencharakteristika, getrennt nach den Untersuchungsorten.

**Tabelle 11: Patientencharakteristika nach Untersuchungsorten**

<b>Patientencharakteristika</b>			
	Gießen n=43	Bad Nauheim n=36	p-Wert
Patientenalter [Jahre]	70,6 ± 8,6	68,4 ± 7,3	p = 0,229
Geschlecht			
männlich	27	26	p = 0,615
weiblich	16	10	p = 0,509
Body mass Index [kg/m <sup>2</sup> ]	27,0 ± 4,1	26,1 ± 2,9	p = 0,272
ASA	3,1 ± 0,3	3,0 ± 0,2	p = 0,092
EF [%]	55,7 ± 7,2	59,2 ± 9,8	p = 0,082
LVEDP [mm Hg]	17,8 ± 9,4	15 ± 8,3	p = 0,168
Anzahl präoperativer Myokardinfakte pro Patient	0,35 ± 0,52	0,31 ± 0,46	p = 0,721

ASA (Score der American Society of Anesthesiologists),  
EF (Ejektionsfraktion), LVEDP (Linksventrikulärer enddiastolischer Druck)

In der Tabelle 11 ist der Durchschnitt der allgemeinen Daten (Alter, Geschlecht, BMI, ASA, EF, LVEDP, Anzahl der präoperativen Infarkte) der Studienpatienten mit dazugehöriger Standardabweichung, getrennt nach den Untersuchungsorten angegeben. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen.

## 3.2 Operationscharakteristika

Tabelle 12: Operationscharakteristika

Operationscharakteristika		Glutamin n=31	Aminosäuren n=27	Kontrolle n=21	p-Wert
Operationszeit [min]		213 ± 67	222 ± 70	229 ± 67	p = 0,795
Extrakorporale Perfusionszeit [min]		104 ± 42	113 ± 46	120 ± 41	p = 0,414
Kardiale Ischämiezeit [min]		68 ± 23	71 ± 30	72 ± 28	p = 0,851
Art der Operation					
	ACB [n]	15	13	15	p = 0,996
	AKE [n]	8	5	2	p = 0,173
	MKE [n]	0	1	0	p = 0,991
	ACB + AKE [n]	5	4	4	p = 0,996
	ACB + MKE [n]	3	2	0	p = 0,263
	AKE + MKE [n]	0	2	0	p = 0,497
Art der Kardioplegie					
	Brettschneider [n]	16	9	7	p = 0,258
	Blutkardioplegie [n]	8	10	4	p = 0,213
	Calafiore [n]	7	8	10	p = 0,081
EKZ-Bilanz [ml]		984 ± 1067	950 ± 1119	1302 ± 970	p = 0,466
CI vor EKZ [l/min/m <sup>2</sup> ]		1,7 ± 0,4	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,5	p = 0,179
CI nach EKZ [l/min/m <sup>2</sup> ]		2,7 ± 0,9	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,6	p = 0,841
SVR vor EKZ [dyn/sec/cm <sup>5</sup> ]		1729 ± 960	1526 ± 607	1529 ± 435	p = 0,494
SVR nach EKZ [dyn/sec/cm <sup>5</sup> ]		1014 ± 343	1081 ± 422	1067 ± 335	p = 0,769
Minimale Temperatur unter EKZ [°C]		31,5 ± 2,2	31,9 ± 2,0	31,3 ± 2,4	p = 0,620
Blutzucker [Maximalwert] [mmol/l]		8,8 ± 2,7	9,5 ± 3,3	8,1 ± 2,7	p = 0,261
Laktat [Maximalwert] [mmol/l]		2,2 ± 1,1	2,3 ± 1,3	1,7 ± 0,5	p = 0,127
Insulin [I.E.]		0,6 ± 2,4	2,3 ± 6	2,7 ± 5,3	p = 0,219
EK [n]		1,6 ± 1,8	1,7 ± 2,3	1,2 ± 1,7	p = 0,659
FFP [n]		0,6 ± 1,2	0,8 ± 1,7	0,4 ± 1,1	p = 0,604
Aprotinin [Mio E.]		0,9 ± 0,9	0,8 ± 0,8	1,0 ± 1,0	p = 0,744
Kristalloide [ml]		1758 ± 693	1685 ± 574	2109 ± 887	p = 0,105
Kolloide [ml]		387 ± 264	350 ± 268	435 ± 265	p = 0,548
Katecholamine					
	Adrenalin [µg]	41 ± 135	30 ± 77	58 ± 229	p = 0,817
	Noradrenalin [µg]	69 ± 159	33 ± 91	86 ± 324	p = 0,640
	Dopamin [µg]	2282 ± 4407	3249 ± 3813	3078 ± 3639	p = 0,623
	Milrinone [µg]	467 ± 1404	600 ± 1603	1001 ± 3286	p = 0,205

ACB (Aortokoronarer Bypass), AKE (Aortenklappenersatz), MKE (Mitralklappenersatz), CI ("Cardiac Index"), EKZ (Extrakorporale Zirkulation), SVR (Systemischer Gefäßwiderstand), EK (Erythrozytenkonzentrat), FFP ("Fresh Frozen Plasma"), TK (Thrombozytenkonzentrat)

In der Tabelle 12 sind die verschiedenen Operationscharakteristika, die in dieser Studie berücksichtigt wurden, dargestellt. Neben der eigentlich durchgeführten Operation und der Art der Kardioplegie, sind auch die absolute Operationslänge und die Zeiten von wichtigen Zwischenschritten, wie der kardialen Ischämie (min) und der extrakorporalen Perfusion (=EKZ, min), aufgeführt.

Es gab keine Unterschiede für die folgenden betrachteten Parameter zwischen den drei Patientengruppen.

Untersuchte Herz-Kreislauf-Parameter sind der Cardiac Index (=CI, Pumpleistung des Herzens,  $\text{l/min/m}^2$ ) vor und nach der EKZ, der systemische Gefäßwiderstand ( $\text{dyn/sec/cm}^5$ ) vor und nach der EKZ und die Bilanz der EKZ (ml). Des weiteren wurde außer dem maximalen Blutzuckerspiegel (mmol/l), dem maximalen Blut-Laktat-Wert (mmol/l) und der minimal erreichten Körperkerntemperatur unter EKZ noch notiert, wie viel Erythrozytenkonzentrat (n), Frischplasma (n), Insulin (I.E.), Aprotinin (Mio.E), kristalloide und kolloide Infusionslösung (ml) und Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Milrinone,  $\mu\text{g}$ ) im Durchschnitt pro Patientengruppe verabreicht wurde.

### 3.3 Klinische Parameter

**Tabelle 13: Klinische Parameter**

#### Klinische Parameter

		Glutamin n=31	Aminosäuren n=27	Kontrolle n=21	p-Wert
CRP [mg/l]	präoperativ	12 ± 15	13 ± 22	16 ± 21	p = 0,287
	postoperativ	10 ± 15	15 ± 25	8 ± 9	p = 0,372
	PoT 1	78 ± 38	93 ± 52	92 ± 32	p = 0,326
	PoT 2	92 ± 82	107 ± 107	94 ± 88	p = 0,810
	PoT 3	114 ± 85	129 ± 118	136 ± 97	p = 0,717
Katecholamine (kumuliert)					
Applikationsdauer [Stunden]		11,7 (0-68)	11 (0-79)	14,2 (0-78)	p = 0,802
Adrenalin [µg]		62 (0-801)	31 (0-295)	63 (0-1129)	p = 0,768
Noradrenalin [µg]		73 (0-917)	46 (0-512)	89 (0-1536)	p = 0,765
Dopamin [mg]		13,2 (0-116)	16,4 (0-57)	9,5 (0-24)	p = 0,481
Dobutamin [mg]		0,61 (0-8,44)	0,62 (0-15,1)	0,09 (0-1,00)	p = 0,635
Milrinone [mg]		10 (0-83)	7 (0-90)	25 (0-226)	p = 0,157
"Assist Device" [Tage]		0,1 (0-4)	0	0,4 (0-3)	p = 0,184
Postoperative Beatmung [Stunden]		12 (3-57)	12 (5-79)	11 (2-78)	p = 0,971
Neurologie [Tage]		1,4 (0-4)	0,8 (0-4)	1 (0-4)	p = 0,145
Kreatinin [mg/dl]					
	präoperativ	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,0 ± 0,2	p = 0,469
	postoperativ	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,3	p = 0,441
	PoT 1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3	p = 0,999
	PoT 2	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,8	1,2 ± 0,4	p = 0,264
	PoT 3	1,2 ± 0,4	1,4 ± 1,0	1,2 ± 0,6	p = 0,252
Harnstoff [mg/dl]					
	präoperativ	43 ± 16	52 ± 25	42 ± 8	p = 0,098
	postoperativ	49 ± 13	53 ± 18	45 ± 9	p = 0,154
	PoT 1	58 ± 18	54 ± 24	48 ± 9	p = 0,171
	PoT 2	71 ± 24	66 ± 30	59 ± 21	p = 0,256
	PoT 3	70 ± 26	83 ± 43	63 ± 21	p = 0,089
Furosemid (kumuliert) [mg]		25 (0-100)	63 (0-720)	48 (0-375)	p = 0,278
GOT [U/l]					
	präoperativ	24 ± 14	27 ± 16	24 ± 14	p = 0,629
	postoperativ	42 ± 24	44 ± 22	34 ± 13	p = 0,236
	PoT 1	56 ± 32	69 ± 57	45 ± 30	p = 0,146
	PoT 2	38 ± 18	46 ± 31	31 ± 18	p = 0,089
	PoT 3	37 ± 19	39 ± 19	34 ± 20	p = 0,676
GPT [U/l]					
	präoperativ	26 ± 21	31 ± 27	32 ± 28	p = 0,638
	postoperativ	-----	-----	-----	
	PoT 1	35 ± 15	36 ± 29	30 ± 12	p = 0,566
	PoT 2	24 ± 14	30 ± 28	25 ± 19	p = 0,527
	PoT 3	29 ± 19	35 ± 28	26 ± 20	p = 0,371
SOFA-Score					
	präoperativ	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	p = 0,999
	postoperativ	6,8 ± 3,4	6,9 ± 3,1	7,9 ± 3,1	p = 0,439
	PoT 1	3,5 ± 1,9	3,5 ± 1,8	4,0 ± 2,5	p = 0,632
	PoT 2	2,5 ± 1,8	2,5 ± 2,1	2,8 ± 2,5	p = 0,855
	PoT 3	1,9 ± 1,7	2,0 ± 2,0	2,0 ± 2,0	p = 0,973

PoT (Postoperativer Tag), CRP (C-reaktives Protein), GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), SOFA ("Sequential Organ Failure Assessment")

In der Tabelle 13 sind die Begleitkriterien, wie unter 2.2 beschrieben, dargestellt. Dabei handelt es sich um klinische Parameter des postoperativen Verlaufs. Es sind jeweils der arithmetische Mittelwert, sowie die dazugehörige Standardabweichung der drei Patientengruppen angegeben.

Die Zahlen in den Klammern geben den minimalen und maximalen gemessenen Wert des zugehörigen Parameters an.

Der SOFA-Score setzt sich aus der Summe der Bewertung von sechs Organsystemen zusammen, wobei jedes einzelne Organ nach funktionellem Zustand mit Punkten von null bis vier beurteilt wird. Vincent et al. konnten in verschiedenen Untersuchungen zeigen, dass der SOFA-Score durchaus als Kontrollparameter zur Beurteilung des Ist-Zustandes und als Verlaufsparemeter von kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation geeignet ist und in Korrelation zur Mortalität dieses Patientenkollektivs steht (91, 92). Die Patienten der drei Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich des CRP-Spiegels, der Anzahl und der Dauer der eingesetzten Katecholamine, der Beatmungsdauer, dem Auftreten neurologischer Komplikationen, der Nierenfunktion einschließlich der Gabe von Diuretika, der Leberfunktion (Transaminasen) und dem SOFA-Score.

### 3.4 Infektionsrate sowie klinisches „Outcome“

**Tabelle 14: Darstellung von infektiologischen Parametern, Liegezeiten und "Outcome"**

	<b>Glutamin n = 31</b>	<b>Aminosäuren n =27</b>	<b>Kontrolle n = 21</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Infektionen [n]</b>	1	0	2	p = 0,558
<b>Antibiotika [n]</b>	4	1	2	p = 0,358
<b>Dauer der Antibiotikagabe [Tage]</b>	4 ±1	4±0	4±1	p = 0,999
<b>Intensivliegezeit [Tage]</b>	2,6 ± 2,0	2,2 ± 1,7	2,0 ± 1,2	p = 0,436
<b>Krankenhausliegezeit [Tage]</b>	9,1 ± 2,8	9,1 ± 3,2	9,2 ± 1,8	p = 0,989
<b>Gestorben [n]</b>	0	0	1	p = 0,403

In der Tabelle 14 sind folgende Parameter zur Beurteilung des klinischen Verlaufes der drei Patientengruppen aufgeführt: Anzahl der aufgetretenen Infektionen, Anzahl der verabreichten Antibiotika, Dauer der Antibiotikagabe in Tagen, Dauer des Aufenthaltes auf Intensivstation in Tagen, die absolute postoperative Krankenhausaufenthaltszeit in Tagen und die Anzahl der verstorbenen Patienten. Es ist bei keinem der dargestellten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar.

### 3.5 Leukozytenzahlen im zeitlichen Verlauf

Tabelle 15: Leukozyten im zeitlichen Verlauf

Leukozyten im Verlauf		Glutamin (n=31)	Aminosäuren (n=27)	Kontrolle (n=21)	p-Wert
<b>Leukozyten [Giga/l]</b>					
präoperativ		4,5 ± 0,9	4,9 ± 2,5	4,8 ± 1,8	p = 0,689
postoperativ		8,9 ± 3,3 } #	9,1 ± 4,9 } #	6,7 ± 3,2 } #	p = 0,075
PoT 1		11,0 ± 2,8 } #	10,9 ± 2,2	10,3 ± 2,7 } #	p = 0,606
PoT 2		11,4 ± 3,0	11,4 ± 2,9	10,8 ± 2,4	p = 0,706
PoT 3		10,0 ± 2,3 } #	10,0 ± 2,4 } #	9,0 ± 1,7 } #	p = 0,232
<b>Lymphozyten [Giga/l]</b>					
präoperativ		1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	p = 0,999
postoperativ		1,4 ± 0,7 } #	1,1 ± 0,5	1,1 ± 0,4	p = 0,078
PoT 1		0,8 ± 0,3 } #	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	p = 0,356
PoT 2		1,1 ± 0,3 } #	1,2 ± 0,3 } #	1,1 ± 0,3 } #	p = 0,444
PoT 3		1,2 ± 0,4	1,4 ± 0,6	1,4 ± 0,6	p = 0,268
<b>Monozyten [Giga/l]</b>					
präoperativ		0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2	p = 0,320
postoperativ		0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,2	p = 0,469
PoT 1		0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	p = 0,999
PoT 2		0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,3	p = 0,462
PoT 3		0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,2	p = 0,999
<b>Neutrophile [Giga/l]</b>					
präoperativ		3,0 ± 1,0	3,4 ± 2,5	3,7 ± 1,9	p = 0,404
postoperativ		7,2 ± 2,8 } #	7,6 ± 4,5 } #	5,4 ± 3,0 } #	p = 0,086
PoT 1		10,0 ± 2,6 } #	9,9 ± 2,3 } #	9,1 ± 2,4 } #	p = 0,392
PoT 2		10,3 ± 2,9	9,8 ± 3,0	9,4 ± 3,9	p = 0,606
PoT 3		8,7 ± 2,6 } #	8,2 ± 2,4 } #	7,2 ± 2,7 } #	p = 0,122

# p<0,05 (Veränderung im zeitlichen Verlauf)  
PoT (postoperativer Tag)

In der Tabelle 15 sind die durchschnittlichen Leukozytenzahlen ( $\cdot 10^9/\mu\text{l}$ ) im Verlauf zu den fünf Messzeitpunkten der drei Patientengruppen dargestellt unter Angabe der Standardabweichung. Zwischen den Werten, die mit einer Klammer und einer Raute verbunden sind, ist eine signifikante Veränderung der Zellzahl im zeitlichen Verlauf zu erkennen.

Die Leukozyten weisen einen signifikanten Anstieg von der prä- zur postoperativen Messung, sowie ein signifikantes Absinken der Zellzahl zwischen dem zweiten und dritten postoperativen Tag in allen drei Patientengruppen auf. Des weiteren steigt die Leukozytenzahl in der Glutamin- und der Kontrollgruppe von der postoperativen Messung bis zum ersten postoperativen Tag signifikant an.

In der weiteren Aufteilung der Leukozyten in ihre Untergruppen sind folgende Veränderungen erkennbar:

Ein signifikanter Anstieg der Lymphozyten ist in allen drei Gruppen von der Messung am ersten zu der Messung am zweiten postoperativen Tag zu sehen. Des weiteren ist in der Glutamingruppe ein signifikanter Anstieg von der prä- zur postoperativen Messung und ein signifikantes Absinken von der postoperativen Messung zur Messung am ersten Tag zu verzeichnen.

In der Gruppe der neutrophilen Granulozyten sind folgende signifikante Veränderungen innerhalb aller Patientengruppen zu sehen: Anstieg von der ersten zur zweiten und von der zweiten bis zur dritten Messung, sowie eine Verminderung der Zellzahl von der vierten zur fünften Messung.

Innerhalb der Gruppe der Monozyten ist keine signifikante Veränderung erkennbar.

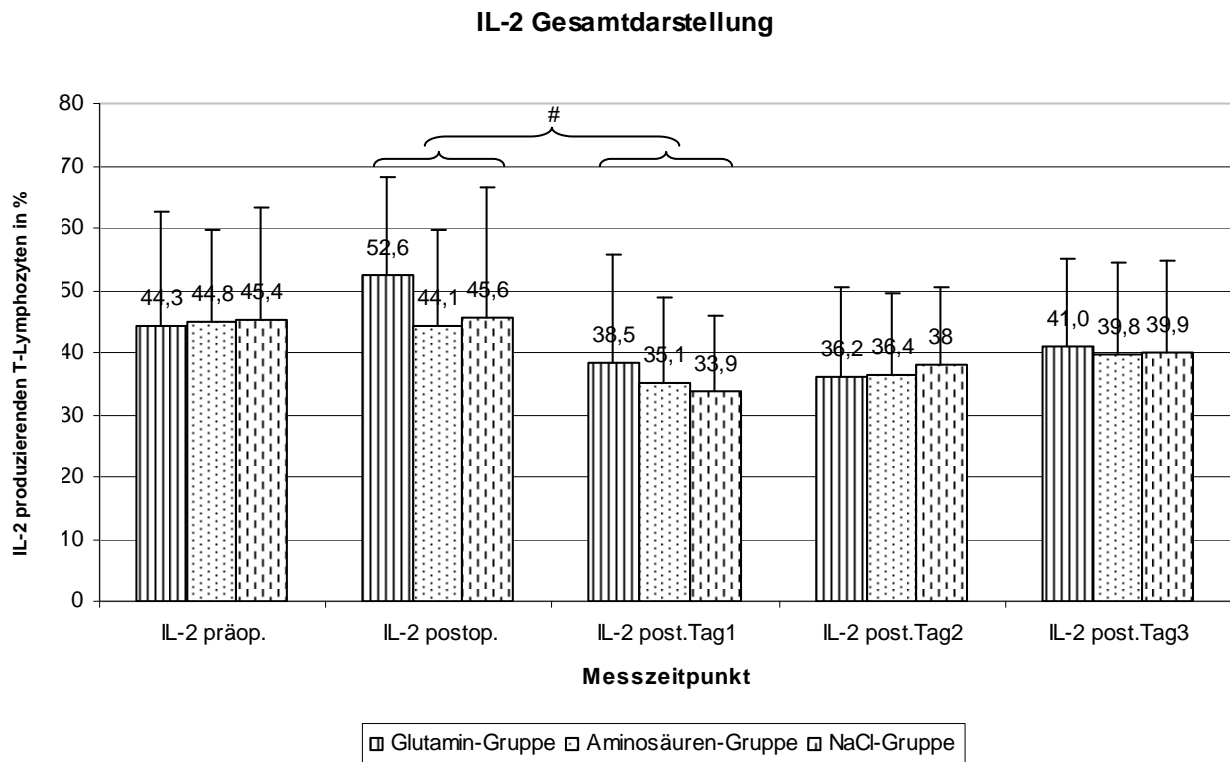
### **3.6. Grafische Darstellung der Messergebnisse**

In den folgenden Grafiken sind die Interleukin produzierenden T-Lymphozyten und der Plasma-Glutamin-Spiegel im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die zu den einzelnen Messreihen gehörenden Werte, eingetragen in Tabellen, sind im Anhang zu finden.

Eine untergliederte Darstellung der einzelnen Messgruppen in die jeweiligen Terzile erfolgte nur in den Ausnahmen, bei denen aufgrund der fehlenden Homogenität der einzelnen Gruppen Unterschiede in den einzelnen Terzilen zu erwarten waren.



### 3.6.1 Interleukin-2, Gesamt



**Abbildung 7: IL-2, grafische Darstellung**

In der Graphik ist die IL-2 Produktion der T-Lymphozyten der drei Patientengruppen im zeitlichen Verlauf dargestellt.

Auf der Abszisse sind die fünf Zeitpunkte der Probenmessungen mit folgenden Abkürzungen aufgetragen: präop. steht für die präoperative Messung, postop. für die postoperative und postop.Tag1-3 stehen für die Messzeitpunkte am Morgen des ersten bis dritten postoperativen Tages.

Auf der Ordinate ist der prozentuale Anteil an stimulierten  $CD3^+$ -T-Lymphozyten aufgetragen, bei denen eine intrazelluläre IL-2-Produktion nachweisbar war.

Die längs gestreiften Säulen repräsentieren die Patienten der Glutamin-Gruppe und der darüber stehende Wert gibt den jeweiligen Mittelwert zu den verschiedenen Messzeitpunkten an.

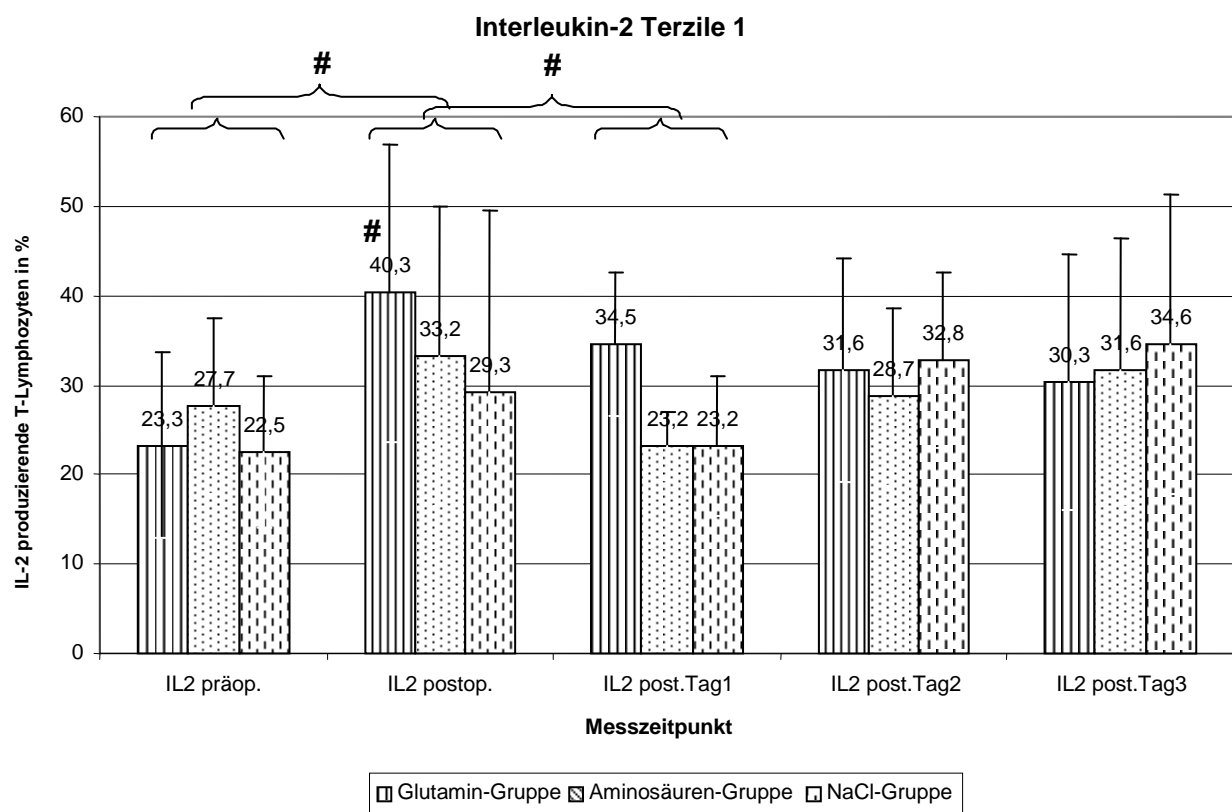
Die weißen Säulen zeigen den zeitlichen Verlauf des Patientenkollektivs der Aminosäuren-Gruppe, mit dem jeweiligen Mittelwert der Messwerte. Zur Darstellung des Verlaufs der NaCl-Patientengruppe sind die längs gestrichelten Säulen in der Graphik aufgetragen, ebenfalls mit den darüber stehenden Mittelwerten.

Die von den einzelnen Mittelwerten senkrecht nach oben ausgehenden Balken sind die zu den Mittelwerten gehörenden Standardabweichungen.

Zwischen den mit Klammern und Raute verbundenen Gruppen war im zeitlichen Verlauf eine signifikante Veränderung an Interleukin produzierenden T-Zellen messbar. Dies entspricht hier einem Absinken des prozentualen Anteils an IL-2 produzierenden T-Lymphozyten zwischen dem Zeitpunkt der postoperativen Messung zur Messung am ersten postoperativen Tag in allen drei Patientengruppen.

Zwischen den einzelnen Patientengruppen ist allerdings kein wesentlicher Unterschied bezüglich der prozentualen Anzahl an IL-2-produzierenden T-Lymphozyten zu den einzelnen Messzeitpunkten erkennbar.

### 3.6.2 Interleukin-2, Terzile 1



**Abbildung 8: IL-2, Terzile 1, grafische Darstellung**

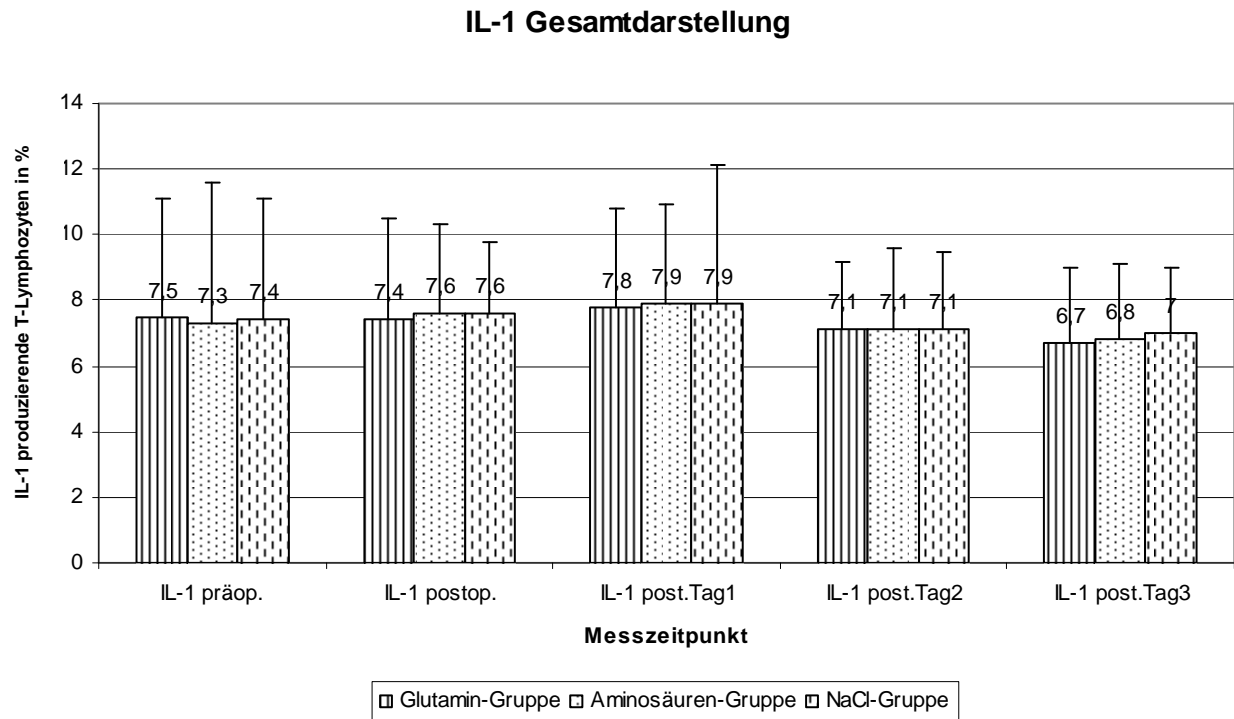
In der Abbildung 8 ist der zeitliche Verlauf des prozentualen Anteils an IL-2 produzierenden CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten der ersten Terzile dargestellt.

Eine signifikante Steigerung des prozentualen Anteils an IL-2 produzierenden T-Lymphozyten tritt in der Terzile-1 zwischen der präoperativen und der postoperativen Messung auf und es ist ein signifikantes Absinken zwischen der postoperativen Messung und der Messung am ersten Tag in allen Patientengruppen erkennbar.

Des weiteren ist in der postoperativen Messung die Anzahl der IL-2 produzierenden T-Zellen in der Glutamingruppe gegenüber den anderen beiden Gruppen signifikant höher.

Der Verlauf der Terzile ist signifikant nicht konstant.

### 3.6.3 Interleukin-1



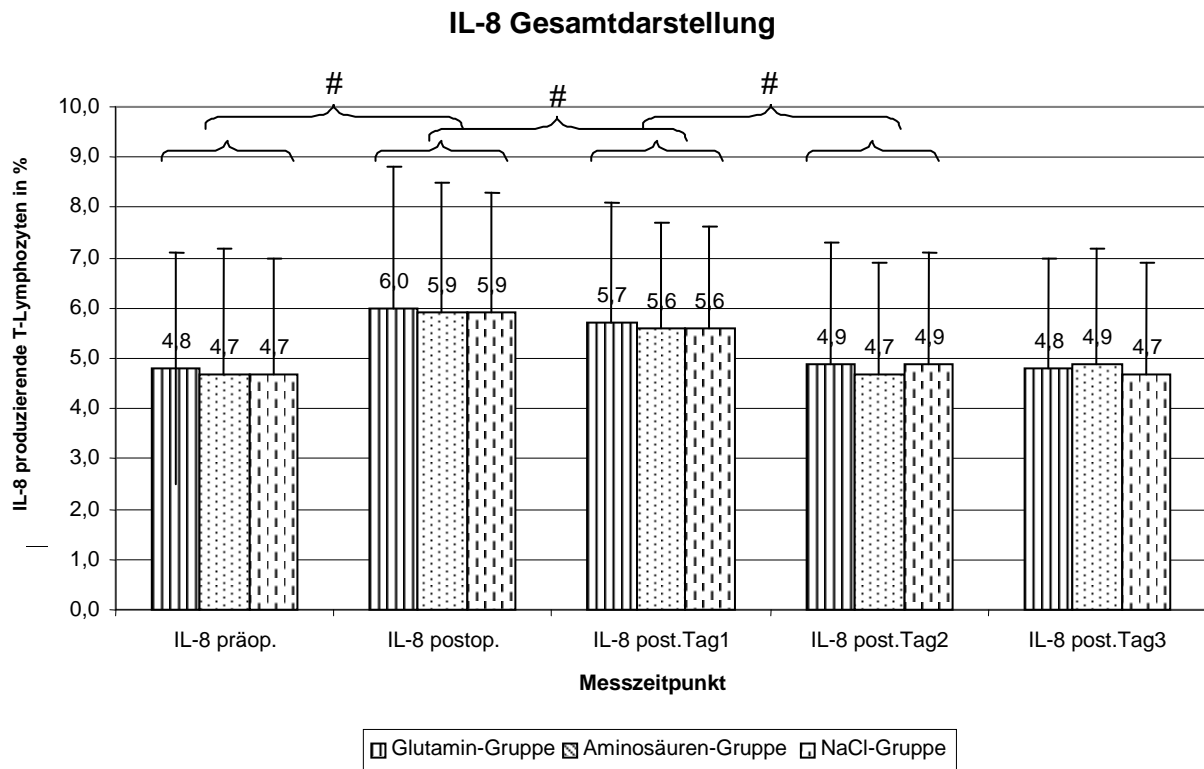
**Abbildung 9: IL-1, grafische Darstellung**

In der Abbildung 9 ist der zeitliche Verlauf des prozentualen Anteils an IL-1 produzierenden CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten dargestellt.

Zwischen den Patientengruppen ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der prozentualen Anzahl an IL-1-produzierenden T-Lymphozyten erkennbar.

Der Verlauf der Terzile ist signifikant nicht konstant.

### 3.6.4 Interleukin-8, Gesamt

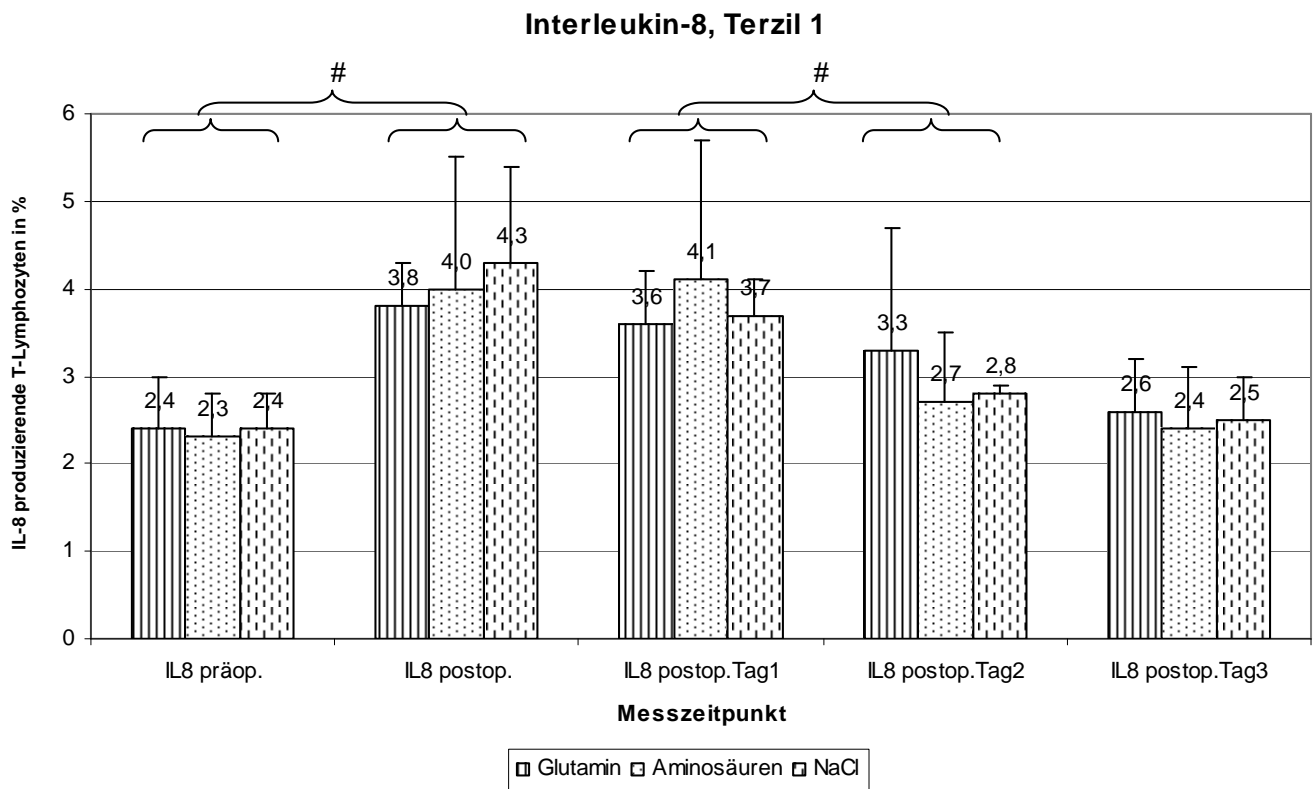


**Abbildung 10: IL-8, grafische Darstellung**

In der Abbildung 10 ist der zeitliche Verlauf des prozentualen Anteils an IL-8 produzierenden CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten dargestellt.

Zwischen den Patientengruppen ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der prozentualen Anzahl an IL-8-produzierenden T-Lymphozyten zu den einzelnen Messzeitpunkten erkennbar. Im zeitlichen Verlauf ist jedoch in allen drei Gruppen ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils an IL-8 produzierende T-Lymphozyten zwischen der prä- und der postoperativen Messung erkennbar. Des weiteren ist in allen drei Gruppen ein signifikanter Abfall zwischen der postoperativen und der Messung am ersten postoperativen Tag, sowie vom ersten auf den zweiten postoperativen Tag zu verzeichnen.

### 3.6.5 Interleukin-8, Terzile 1



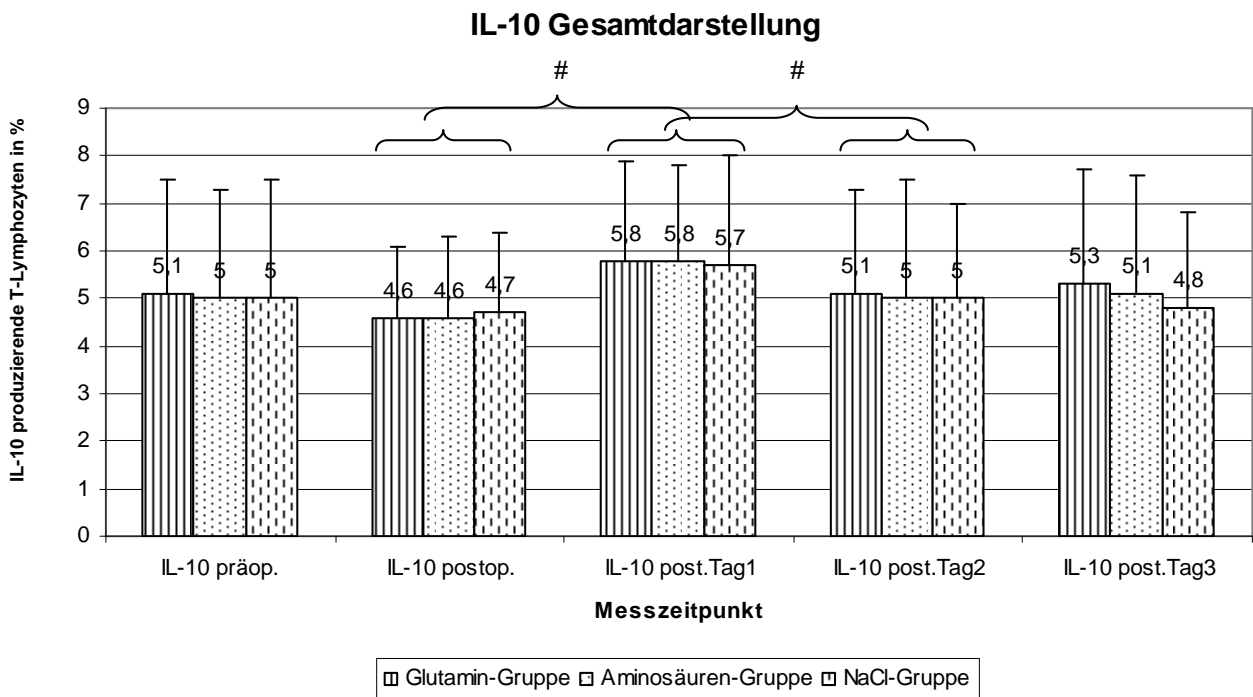
**Abbildung 11: IL-8, Terzile 1, grafische Darstellung**

In der Abbildung 11 ist der zeitliche Verlauf des prozentualen Anteils an IL-8 produzierenden CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten der ersten Terzile dargestellt.

Zwischen den Patientengruppen ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der prozentualen Anzahl an IL-8-produzierenden T-Lymphozyten zu den einzelnen Messzeitpunkten erkennbar.

Im zeitlich Verlauf ist ein signifikanter Anstieg zwischen der präoperativen und der postoperativen Messung und ein signifikanter Abfall zwischen der Messung am ersten und am zweiten postoperativen Tag in allen drei Gruppen zu erkennen.

Der Verlauf des zeitlichen Durchschnitts lässt zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede erkennen, lediglich der Verlauf der Terzile ist signifikant nicht konstant.



### Abbildung 12: IL-10, grafische Darstellung

Der Verlauf des zeitlichen Durchschnitts lässt zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede erkennen, lediglich der Verlauf der Terzile ist signifikant nicht konstant.

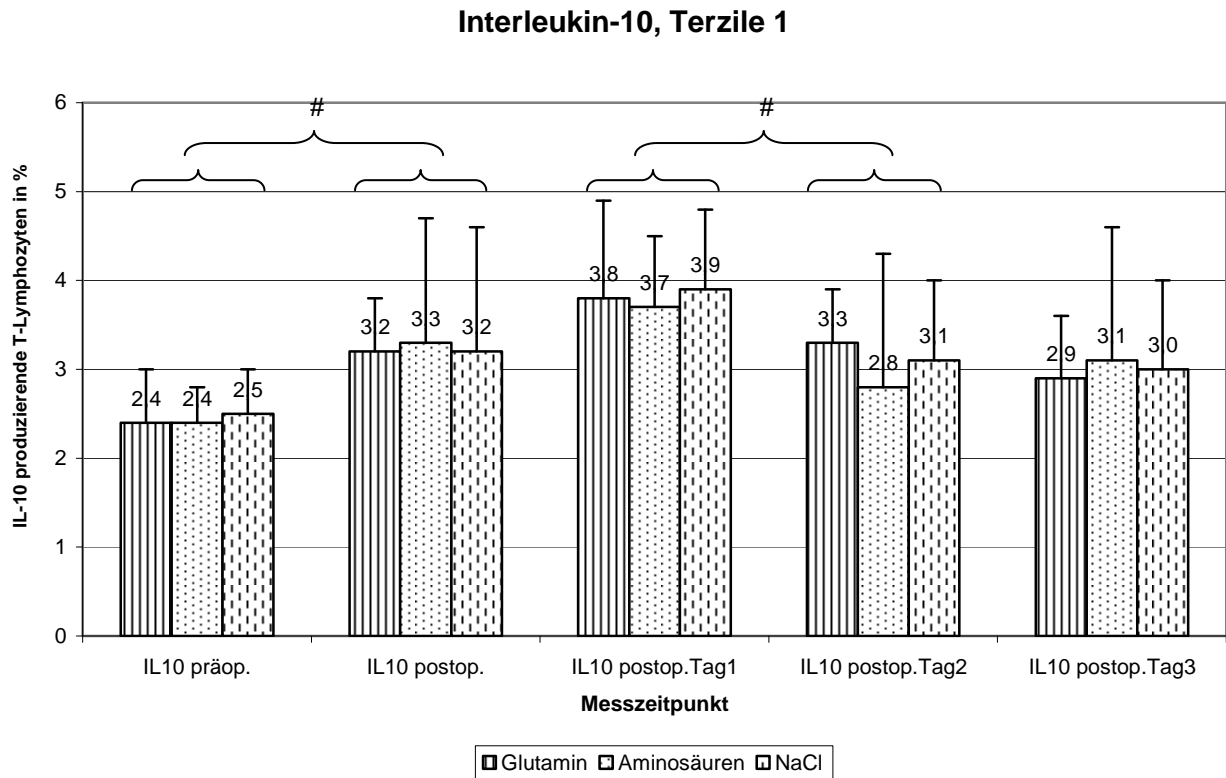
In der Abbildung 12 ist der zeitliche Verlauf des prozentualen Anteils an IL-10 produzierenden CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten dargestellt.

Zwischen den Patientengruppen ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der prozentualen Anzahl an IL-10-produzierenden T-Lymphozyten zu den einzelnen Messzeitpunkten erkennbar.

Im zeitlichen Verlauf ist jedoch in allen drei Gruppen ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils an IL-10 produzierenden T-Lymphozyten zwischen der postoperativen und der Messung am ersten postoperativen Tag erkennbar. Des weiteren ist in allen drei Gruppen ein signifikanter Abfall zwischen der Messung vom ersten postoperativen auf den zweiten postoperativen Tag zu verzeichnen.

Der Verlauf des zeitlichen Durchschnitts lässt zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede erkennen, lediglich der Verlauf des Terzile ist signifikant nicht konstant.

### 3.6.7 Interleukin-10, Terzile 1



**Abbildung 13: IL-10, Terzile 1, grafische Darstellung**

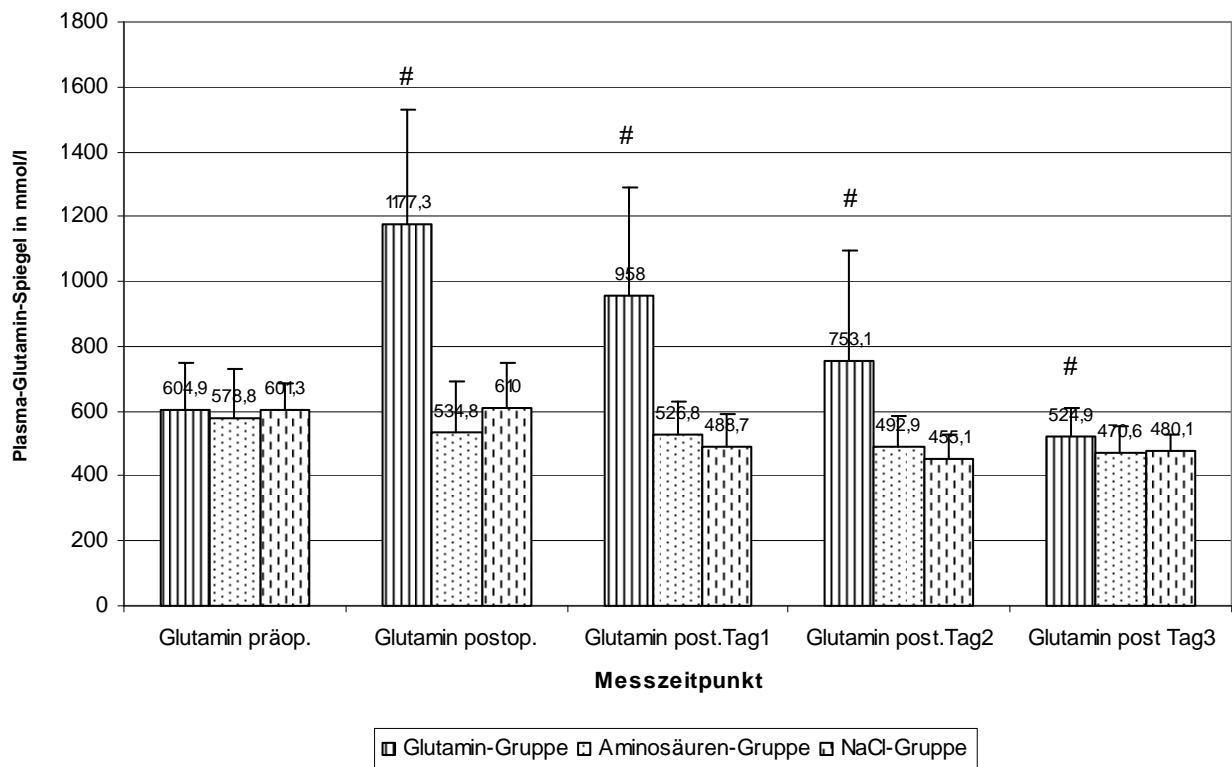
In der Abbildung 13 ist der zeitliche Verlauf des prozentualen Anteils an IL-10 produzierenden CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten dargestellt.

Zwischen den Patientengruppen ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der prozentualen Anzahl an IL-10-produzierenden T-Lymphozyten zu den einzelnen Messzeitpunkten erkennbar.

In der Terzile 1 ist ein signifikanter Anstieg zwischen der präoperativen und der postoperativen Messung und ein signifikanter Abfall zwischen der Messung am ersten und am zweiten postoperativen Tag in allen drei Gruppen zu erkennen.

### 3.6.8 Plasma-Glutamin-Spiegel

#### Plasma-Glutamin-Spiegel Gesamtdarstellung



**Abbildung 14: Plasma-Glutamin-Spiegel, grafische Darstellung**

In der Abbildung 14 ist der zeitliche Verlauf des Plasma-Glutamin-Spiegels der drei Patientengruppen dargestellt.

Auf der Ordinate sind die fünf Zeitpunkte der Probenmessung gekennzeichnet. Auf der Abszisse ist der Plasma-Glutamin-Spiegel in mmol/l aufgetragen.

Die Plasma-Glutamin-Spiegel der Glutamingruppe ist im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen zu den Zeitpunkten der postoperativen Messung und den Messungen am ersten, zweiten und dritten postoperativen Tag signifikant höher.



## **4. Diskussion**

### **4.1 Bestimmung intrazellulärer Zytokine mittels Durchflusszytometrie**

#### *4.1.1 Die Methodik:*

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, Zytokine qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Häufig wird diese Untersuchung mit Hilfe von ELISA oder RIA durchgeführt (63, 74, 95). Mit diesen Techniken lassen sich produzierte und bereits ins Plasma sezernierte Zytokine vor allem mengenmäßig beurteilen. Ein Hauptproblem dieser Methodik besteht in der kurzen Halbwertszeit der meisten Mediatoren (94). Bei einer längeren Stimulationszeit oder nicht sofortigem Messen der Proben nach der Aufarbeitung, können falsch niedrige Werte bestimmt werden. Des Weiteren kann durch einen gemessenen Zytokinspiegel keine exakte Aussage über das Vorliegen von biologisch aktiven Zytokinen getroffen werden, da diese zum Teil an Rezeptoren gebunden sein können und damit ihre Funktion verloren haben. Dennoch werden sie noch über bestimmte Oberflächenstrukturen nachgewiesen. Aber auch Zellen und andere Mediatoren können die Messergebnisse beeinflussen. So binden beispielsweise Erythrozyten frei zirkulierendes IL-8 und entziehen es so einer laborchemischen Bestimmung (7).

Ein weiteres Problem besteht darin, dass sich mit einem gemessenen Zytokinspiegel nur eine bedingte Aussage über die Herkunftszellen treffen lässt, da viele Zytokine von verschiedenen Zellen, wie Makrophagen, Endothelzellen oder T-Lymphozyten, produziert werden können. So kann man bei bestimmten Fragestellungen einer Studie nur mit der generellen Veränderungen von Zytokinspiegeln antworten, diese aber nicht einer veränderten Zellantwort in differenzierter Weise den einzelnen Zellreihen zuordnen. Dies würde sonst zu falsch hohen Ergebnissen führen (61).

Umgehen lässt sich dieses Problem, indem die Zellpopulationen mittels Dichtegradient oder immunologischer Beads isoliert werden. Die danach produzierten Zytokine lassen sich somit den einzelnen Zellen zuordnen. Allerdings ist die Aussage dieser Messergebnisse auch nicht uneingeschränkt verwendbar. Durch den Prozess der Auftrennung der Zellen kann es bereits zu einer ex vivo Stimulation der Zellen kommen, was ebenfalls zu falsch hohen Ergebnissen führen kann (61). Somit entspricht das vorliegende stark veränderte Milieu nicht mehr den physiologischen Bedingungen.

Die in dieser Studie verwendete Methode der immunfluoreszierenden Durchflusszytometrie erfasst den prozentualen Anteil an T-Zellen, die ein bestimmtes Zytokin produziert haben. Der Nachweis erfolgt über fluoreszierende Antikörper, die ein bestimmtes, intrazellulär gebunden vorliegendes Zytokin markieren. Vorteil dieser Methode ist, dass sich über oberflächenspezifische Antikörper die T-Zellen von den anderen Zellpopulationen erkennen

und abgrenzen und sich weiter untereinander in zytokinproduzierend und nichtzytokinproduzierend unterteilen und bestimmen lassen (8).

Da es sich um ein relativ schnelles Messverfahren handelt, können innerhalb von Minuten tausende von Zellen bestimmt und ausgewertet werden. Die Zellen liegen im Vollblut vor, was bedeutet, dass das Verhältnis der relativen Zellanteile zu der Situation der Patienten in vivo nicht verändert wird. Auch das normale Verhältnis an Substraten, so auch an Glutamin, wird beibehalten. Dadurch liegen weitestgehend physiologische Verhältnisse vor, die eine artifizielle in vitro Stimulation der Zellen vermeiden soll (8, 61).

Mit dieser Methode wird allerdings nur der relative Anteil an zytokinproduzierenden Zellen erfasst, weshalb sich keine Aussage über die absolute Menge an produzierten Zytokinen treffen lässt.

#### *4.1.2 Die Stimulation:*

Ohne jegliche Aktivierung der Zellen ist die Zytokinproduktion häufig sehr gering. Diese lässt sich durch eine bewusste in vitro Stimulation steigern. Dadurch erhält man eine Aussage, in wie weit die Zellen in bestimmten Stresssituationen, wie chirurgischen Eingriffen oder Erkrankung, in ihrer Funktion beeinträchtigt sind (2). Zu beachten ist, welche Methode zum Aktivieren der Zellen verwendet wird, da verschiedene Produkte unterschiedliche Reaktionen auf Zellebene hervorrufen. Beispielsweise entfalten verschiedene Agenzien nur auf bestimmte Zelltypen eine optimale Wirkung. So ist das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) ein gutes Agens zur Stimulation von B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Die Wirkung auf T-Lymphozyten ist allerdings nur gering (102). Diese reagieren dagegen auf Concanavalin A (Con A) ebenfalls bei einer Inkubationszeit von 24h und einer Glutaminkonzentration von mindestens 0,1 mM mit einer gesteigerten Zytokinproduktion. Im Überstand ließ sich eine doppelte IL-2, eine vierfache IL-10 und eine über vierfache Konzentration an IFN- $\gamma$  nachweisen. Con A entfaltet hingegen nur eine geringe Wirkung auf B-Lymphozyten (102).

Aber auch auf die unterschiedlichen Subtypen einer Population können Stimulanzen unterschiedlich wirken. Die Forschungsgruppe von Chang et al. (9) kamen in einer Studie zu dem Ergebnis, dass durch Phytohämagglutinin (PHA) gleichermaßen Th1- und Th2-Zellen aktiviert werden. Hingegen wurde durch Bazillus Calmette-Guérin (BCG) lediglich die Th1-Subpopulation zur Proliferation und die für sie typische Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  angeregt. Das Masernvirus wiederum aktivierte die Th2-Zellen, die sich auf den Reiz vermehrt teilten und die Zytokine IL-4 und IL-10 produzierten.

Zur Aktivierung in vivo sind die T-Zellen von anderen Zellen des Immunsystems abhängig. Sie selber sind nicht in der Lage, native Antigene zu erkennen und durch diese direkt aktiviert zu werden. Sie können aber mit modifizierten Proteinantigenen über ihren T-Zellrezeptor (TZR) reagieren, die von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) mithilfe von MHC-Molekülen präsentiert werden (26). Zusätzlich benötigen die T-Zellen ein zweites Signal, ein so genanntes co-stimulatorisches Signal über ein weiteres Rezeptor-Ligandenpaar (97).

Die Co-Stimulation von TZR und CD28-Rezeptor, die für die optimale Aktivierung von T-Zellen notwendig ist, kann durch die pharmakologischen Agenzien Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore ersetzt werden (89). PMA aktiviert die intrazelluläre Proteinkinase C.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore wie das Ionomycin führen zu einer Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ . Zusammen gelingt es den beiden Reagenzien eine vollständige T-Zellaktivierung zu induzieren, wie sie in vivo durch Ligation der TZR und co-stimulatorischer Moleküle erfolgt (97). Dieses Verfahren wendeten wir auch in unserer Studie an.

#### **4.2 Die perioperative Polarisation der T-Lymphozyten**

In mehreren Studien mit Patienten, deren Operation unter Zuhilfenahme eines extrakorporalen Herzkreislaufsystems stattfand, wurden Veränderungen der zellulären Kommunikation auf Zytokinebene untersucht. Dabei wurde folgendes entdeckt: Die Konzentration an IL-2 fällt postoperativ signifikant ab (34, 56, 67), während gleichzeitig die Produktion an IL-10 ansteigt (59, 67). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch den operativen Eingriff und den Einsatz der HLM eine Polarisation des Immunsystems stattfindet, die gleichzeitig eine Immunsuppression und eine Immunstimulation beinhaltet. Im Rahmen dieser Polarisation muss man zwischen drei Typen von T-Helferzellen unterscheiden: T-Helfer1-Zellen (Th1-Zellen), T-Helfer2-Zellen (Th2-Zellen) und T-Helfer0-Zellen (Th0-Zellen) (77). Diese T-Zelltypen entstehen nicht aus unterschiedlichen Zelllinien sondern entwickeln sich aus den selben Vorstufen von T-Helferzellen (77). Reize durch bestimmte Zytokinmuster können die Differenzierung aus der Vorläuferzelle bestimmen. Beispielsweise stellt das frühzeitige Vorkommen von IL-4 den potentesten Stimulus zur Th2-Differenzierung dar, während IL-12 oder die Interferone eine Th1-Entwicklung favorisieren (77). Was aber letztendlich den Mechanismus darstellt, der die frühzeitige IL-4 Produktion und damit die Differenzierung der T-Helferzellen zu Th2-Zellen bewirkt, ist nicht vollends geklärt (77). Die Th0-Zellen stellen eine heterogene Population von teilweise differenzierten Effektorzellen dar, die Zytokine der Th1- und Th2-Zellgruppen produzieren können (77).

Th1-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen und sind an der Modulation von Immunreaktionen vom späten Typ beteiligt, sie aktivieren Makrophagen und neutrophile Granulozyten (77, 88). Zudem fördern sie die Produktion von opsonierenden Antikörpern und beschleunigen die Bildung von zytotoxischen T-Effektorzellen. Insgesamt sorgen Th1-Zellen für eine effiziente Abtötung von extra- und intrazellulären Bakterien, Viren, Pilzen und Tumorzellen (88). Sie spielen damit eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen. Th2-Zellen fördern hingegen Immunreaktionen vom Soforttyp, einerseits durch die Induktion der Produktion von nicht-opsonierenden Antikörpern, insbesondere der Immunglobulin E-Klasse. Andererseits durch die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen (88). Diese Reaktionen werden beispielsweise durch Parasiten hervorgerufen, spielen aber auch bei IgE-vermittelten allergischen Reaktionen vom Soforttyp eine Rolle (88). Die jeweiligen Immunantworten werden durch Zytokinprofile reguliert, die in beiden Zellgruppen unterschiedlich sind. Th1-Zellen produzieren IL-2 und IFN- $\gamma$  (65, 88), während Th2-Zellen vor allem IL-4, IL-10 und IL-13 bilden (77, 88). Die Zytokine der jeweiligen T-Zellgruppen kontrollieren nicht nur bestimmte Immunprozesse, sondern haben auch einen Einfluss auf die jeweils andere T-Zellpopulation. Die Zytokine der Th1-Zellen, vor allem das IFN- $\gamma$ , unterdrücken die Differenzierung und Proliferation der Th2-Zellen. Umgekehrt supprimieren die Zytokine der Th2-Zellen, wie das IL-10, die Proliferation und Differenzierung der Th1-Zellen (88). In ihrer Funktion sind die Th1-Zellen eher für die Vermittlung einer zellulären Immunantwort zuständig, indem sie beispielsweise das für die Aktivierung der Makrophagen notwendige IFN- $\gamma$  produzieren (66). Die Th2-Zellen sind hingegen mehr für die Vermittlung einer humoralen Immunantwort verantwortlich, da sie über ihr Zytokinprofil die B-Zellen zur Sekretion von Immunglobulinen anregen können (65, 66). Eine derartige Veränderung des Th1/Th2-Gleichgewichtes, das mit einer Hemmung der Th1-Zellpopulation einhergeht, hat einen massiven Einfluss auf die Infektabwehr (65). Diese Form der Polarisierung des Immunsystems ist allerdings kein Phänomen, das nur in der Kardiochirurgie zu finden ist. Derartiges zeichnet sich an verschiedenen Patientenkollektiven aus nahezu allen chirurgischen Fachbereichen, bei denen größere Eingriffe durchgeführt werden, ab. So beobachteten Decker et al. (14) bei Patienten, die laparoskopisch cholezystektomiert wurden, dass bereits zwei Stunden nach dem Eingriff einerseits die Produktion an IL-4 merklich anstieg und andererseits die Bildung von IFN- $\gamma$  abfiel, proportional zum chirurgischen Trauma. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte eine Studie an Patienten nach großen chirurgischen Eingriffen. Dort verminderte sich die Konzentration an IL-2 und IFN- $\gamma$ , während die Produktion von IL-10 anstieg (31).

Nach kardiochirurgischen Operationen birgt diese Form der Polarisierung des Immunsystems eine besondere Gefährdung für die Patienten, da eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Infektionen und der Hemmung der IL-2 Produktion besteht, bei der die lymphozytäre Reaktion auf mitogene Stimuli signifikant vermindert ist (34).

Die IFN- $\gamma$  und die IL-2 Produktion, typische Th1-Zytokine, sind während des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine (HLM) vermindert, was nahe legt, dass die HLM im Zusammenhang mit einer Verschlechterung der Th1-Zellfunktion steht (68).

Die Erhöhung der Konzentration an IL-10 bei gleichzeitig reduzierter Sezernierung an IL-2 lässt darauf schließen, dass die Th1-Antwort durch immunmodulatorische Mechanismen unterdrückt ist, und die Th2-Antwort stimuliert wird (67). Normalerweise werden jedoch beide Zellgruppen zur adäquaten Immunantwort benötigt und stehen daher unter ständigem gegenseitigem Einfluss. DeAngeli et al. (13) und Naldini et al. (67) behaupten außerdem, dass durch die HLM nicht nur das Th1/Th2 Verhältnis verändert ist, sondern auch eine Verminderung der Lymphozyten um 60% beziehungsweise 50% am ersten postoperativen Tag auftritt. Bei diesen Angaben handelt es sich jedoch um Prozentangaben, die sich auf die absolute Leukozytenzahl beziehen. Betrachtet man diese Werte im Vergleich zu den Gesamtleukozyten, so vermindert sich die Anzahl an Lymphozyten in beiden Studien nur unwesentlich. Die Gesamtleukozytenzahl nimmt jedoch auf jeweils etwa das Doppelte zu, woran hauptsächlich die neutrophilen Granulozyten beteiligt sind.

In unserer Studie kamen wir zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Die Gesamtleukozytenzahl stieg in allen drei Gruppen auf über das Doppelte an, wovon die neutrophilen Granulozyten den größten Anteil ausmachten. In allen drei Gruppen verdreifachten sie sich etwa in dem selben Zeitraum. Hingegen veränderte sich die Anzahl der Monozyten zu keinem Messzeitpunkt erwähnenswert. Die Anzahl an Lymphozyten vermindert sich auch in unserer Studie in allen drei Gruppen von 1,0 Giga/l auf 0,8 Giga/l (Glutamin) beziehungsweise von 1,0 Giga/l auf 0,9 Giga/l (Aminosäuren und NaCl). Damit entspricht unser Ergebnis dem von Naldini et al. (67) und DeAngeli et al. (13). Dieses Resultat suggeriert, dass die Veränderungen in der Immunsituation nach HLM zumindest nicht hauptsächlich durch eine verminderte Lymphozytenzahl verursacht sein kann.

#### **4.3 Die Bedeutung des Plasma-Glutamin-Spiegels und Detektion von intrazellulärem IL-2 bei stimulierten T-Lymphozyten**

Genau wie jedes andere Gewebe ist auch das Immunsystem von Nährstoffen abhängig, die es für eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen benötigt. Dazu gehören unter anderem die Bereitstellung von Energie, die Proteinsynthese und die Proliferation. Das Immunsystem bildet ein relativ großes Organ mit einer großen Proliferationsaktivität, wozu es verschiedene Nährstoffe als Co-Faktoren benötigt. Deshalb spricht es besonders sensibel auf Formen der Malnutrition an (36). Dies ist besonders der Fall bei Infektionen, wenn das Abwehrsystem aktiviert ist und größere Mengen an Substraten benötigt werden. Selbst in nicht aktiviertem Zustand benötigen Lymphozyten und Makrophagen relativ große Mengen an Nährstoffen. Dabei scheinen sie besonders stark von Glutamin abhängig zu sein, offenbar sogar stärker als von Glukose (36). Nur ein geringer Anteil an Glukose und Glutamin wird von den Lymphozyten vollständig oxidiert, obwohl alle Enzyme für den Zitratzyklus vorhanden sind. Newsholme et al. (70) stellen die These auf, dass der Grund für den geringen vollständigen Abbau in der Bereitstellung von großen Mengen an Substrat für die Pyrimidin- und Purinsynthese zu sehen ist. Im Fall einer Aktivierung können die Lymphozyten so deutlich schneller mit Proliferation und Proteinsynthese (Interleukinproduktion) reagieren (36).

Bevor man sich in der Vergangenheit mit dem möglichen Nutzen der Darreichung von Glutamin für den Patienten auseinander setzen konnte, musste man erst noch eine Lösung zur Umgehung der ungünstigen physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Aminosäure finden. Freies Glutamin geht zum einen schnell in seine zyklische Form unter Abgabe von toxischem Ammoniak über (24). Zum anderen hat es mit 35 g/l bei 20°C nur eine relativ geringe Löslichkeit in Wasser (23). Erst mit der Möglichkeit der Dipeptidsynthese war es möglich, Glutamin in großem Maße zur Immunnutrition einzusetzen und genauer zu erforschen. Zwei verschiedene Dipeptide haben sich für diesen Zweck als besonders nützlich erwiesen: L-Glycin-L-Glutamin (Gly-Gln) und L-Alanin-L-Glutamin (Ala-Gln). Sie sind beide stabil in wässriger Lösung und nahezu ohne Komplikationen und Nebenwirkungen einsetzbar (23). Ein Unterschied besteht jedoch in der Löslichkeit der beiden Produkte. Ala-Gln ist mit 568 g/l deutlich besser löslich als Gly-Gln mit 154 g/l.

In unserer Studie entschieden wir uns für Ala-Gln und einem Substitutionsäquivalent von 0,5 g Glutamin pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag. Über die genaue Menge an Glutamin, die verabreicht werden sollte, herrscht derzeit noch wenig Klarheit. P. Fürst (23) empfiehlt eine tägliche Mindestgabe von 13-20 g Glutamin für bestimmte Krankheitsbilder, wie großes Trauma oder elektive chirurgische Eingriffe. Unter Verweis auf andere Studien vermutet er

aber, dass Patienten mit schwereren Erkrankungsbildern, wie zum Beispiel SIRS, Sepsis oder Polytrauma wahrscheinlich deutlich höhere Dosen benötigen.

Die Zellen des Immunsystems decken ihren Bedarf an Glutamin aus dem Plasma. Deshalb ist die Höhe des Plasma-Glutamin-Spiegels ein entscheidendes Kriterium für die Qualität der Lymphozytenfunktion. Wie bereits erwähnt beträgt dieser unter physiologischen Bedingungen etwa 600-700  $\mu\text{M}$  (27, 79, 83). Diese Angaben entsprechen auch den präoperativ gemessenen Werten unserer Patienten: 604,9  $\mu\text{M}$  (Glutamin), 578,8  $\mu\text{M}$  (Aminosäuren) und 601,3  $\mu\text{M}$  (NaCl). Welche Konzentration jedoch mindestens benötigt wird und in welchem Bereich sich das Optimum für die Funktion der Lymphozyten befindet ist unklar. In verschiedenen Studien wurde experimentell versucht, eine möglichst genaue Antwort zu finden. In diesem Zusammenhang stimulierten Yaqoob et al. (102) Lymphozyten in vitro mit Con A bei unterschiedlichen Glutaminkonzentrationen. In einem glutaminfreien Medium war kaum eine Produktion der zu bestimmenden Zytokine nachweisbar, während bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ein starker Anstieg erfolgte. Eine weitere Erhöhung der Glutaminkonzentration führte zu keinem weiteren nennenswerten Anstieg der Zytokinproduktion. Chang et al. (9) kamen in ihrer Untersuchung auf einen deutlich höheren Wert von 600  $\mu\text{M}$ . Als optimale Konzentration geben Kircher et al. (48) sogar 2000  $\mu\text{M}$  an. Über die angegebenen optimalen Konzentrationen hinaus war in keiner der Studien eine weiter erhöhte lymphozytäre Reaktion zu verzeichnen.

Glutamin scheint aber nicht nur einen Einfluss auf das Proliferationsvermögen und die Zytokinproduktion zu haben, sondern übt auch eine direkte protektive Wirkung auf bestimmte Zellen aus. Unter in vitro Stimulation von T-Zellen mit PMA und Ionomycin steigt durch die beiden Agenzien die Anzahl an apoptotischen T-Zellen. Befindet sich in den Proben zusätzlich Glutamin, so ist die Anzahl an Apoptosen signifikant vermindert. Aber nicht nur die agenzieninduzierte sondern auch die Anzahl an natürlich auftretenden Apoptosen in unstimulierten Proben lässt sich durch Glutamin signifikant reduzieren (10).

In unserer Studie wurde ein durchschnittlicher Plasmaglutaminspiegel von 1177,3  $\mu\text{M}$  in der postoperativen Messung der Glutamingruppe gemessen, was etwa eine Verdopplung des präoperativen Wertes ausmacht. Entsprechend den zitierten Studien fallen die Glutaminspiegel in unseren beiden Gruppen, die kein Glutamin erhalten haben, nach der Operation und dem damit verursachten Trauma, kontinuierlich bis auf einen Wert von 470,6  $\mu\text{M}$  (Aminosäuren) beziehungsweise 480,1  $\mu\text{M}$  (NaCl) am dritten postoperativen Tag ab. Trotz eines deutlich höheren Glutaminspiegels in der Glutamingruppe, konnten wir im Vergleich mit den beiden anderen Gruppen keine Unterschiede bei der Anzahl an Lymphozyten nachweisen.

Eine Antwort für dieses Verhalten mag in den bereits zitierten Studien von Chang et al. (9) und Yaqoob et al. (102) erkennbar sein. Mit einem Glutaminspiegel von knapp unter 500  $\mu\text{M}$  liegen die beiden Gruppen, die kein Glutamin erhalten haben noch relativ nahe an physiologischen Werten, weshalb die Lymphozyten scheinbar nicht in ihrer Funktion aufgrund eines Substratmangels eingeschränkt sind. Die Beobachtung, dass unter weiter erhöhten Spiegeln, wie bei uns in der Glutamingruppe zu sehen, keine erhöhte Zellteilung und Zytokinspiegel mehr zu erreichen sind, deckt sich auch mit den angesprochenen Studien.

Mit Hilfe von experimentellen Studien wurde aber nicht nur das Proliferationsverhalten der Lymphozyten unter verschiedenen Glutaminkonzentrationen untersucht, sondern auch, ob die Produktionsfähigkeit der T-Lymphozyten an IL-2 unter Anwesenheit dieser Aminosäure optimiert werden kann. In diesem Zusammenhang stimulierten Rhode et al. (76) *in vitro* Zellen im Vollblut für 24 Stunden mit PHA und verzeichneten bei einer Glutaminkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur glutaminfreien Kontrolle eine signifikant gesteigerte IL-2 Produktion. Auch bei höheren Glutaminwerten nahm diese nicht weiter zu. Aufgrund näherer Beobachtungen behaupteten sie sogar, dass der Einfluss von Glutamin auf die Lymphozytenproliferation damit zu erklären sei, dass Glutamin für die Synthese von IL-2 essentiell ist (76).

Chang et al. (10) stimulierten ihre Proben für 24 h mit Ionomycin und PMA. Auch hier entwickelte sich eine signifikant erhöhte IL-2 Konzentration im Plasma. Allerdings geben die Autoren mit 2000  $\mu\text{M}$  einen höheren Wert für die optimale Glutaminkonzentration an. Auch konnten sie eine erhöhte Proliferationsrate der T-Zellen bei steigender Glutaminkonzentration bis 1000  $\mu\text{M}$  messen (10). Ebenfalls bezüglich der gesteigerten IL-2 Produktion geben Kirchner et al. (48) 2000  $\mu\text{M}$  als optimale Glutaminkonzentration *in vitro* an. Sie stimulierten die Zellen im Ansatz mit PHA.

In unserer Studie konnten wir eine deutliche Verminderung an IL-2 produzierenden T-Zellen von der postoperativen Messung bis zum ersten Tag in allen drei Gruppen feststellen. Eine Erholung bis auf präoperative Werte fand bis zum dritten Tag nicht vollständig statt. Der prozentuale Anteil an zytokinproduzierenden T-Lymphozyten ist in der postoperativen Messung mit 52,6% in der Glutamingruppe im Vergleich zu 44,1% (Aminosäuren) und 45,6% (NaCl) zwar als höher erkennbar, jedoch ohne dass dies einen signifikanten Unterschied ausmacht. Die gleiche Tendenz ist auch für die Messung am ersten Tag mit 38,5% (Glutamin), 35,1% (Aminosäuren) und 33,9% (NaCl) feststellbar. Die Plasmaglutaminspiegel, die wir an den beiden Zeitpunkten gemessen haben, lagen postoperativ bei 1177  $\mu\text{M}$  und am ersten Tag bei 958  $\mu\text{M}$  (Glutamin) beziehungsweise bei 531  $\mu\text{M}$  und 520  $\mu\text{M}$  (Aminosäuren) und bei



610  $\mu\text{M}$  und 488  $\mu\text{M}$  (NaCl). Da wir für den Ansatz die Vollblutproben mit einer glutaminfreien RPMI-Lösung als Nährmedium 1:1 verdünnt haben, müssen wir in unseren Proben von den halben Glutaminspiegeln ausgehen. Das bedeutet: Am ersten postoperativen Tag lag bei einem Glutaminspiegel von 480  $\mu\text{M}$  (Glutamin), 265  $\mu\text{M}$  (Aminosäuren) und 305  $\mu\text{M}$  (NaCl) kein signifikanter Unterschied an IL-2 produzierenden T-Zellen zwischen den Gruppen vor. Ein Hinweis darauf, dass die Zellen scheinbar erst durch Glutaminspiegel unter 265  $\mu\text{M}$  wesentlich in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den Entdeckungen von Chang et al. (10) und Kirchner et al. (48), die unter steigender Glutaminkonzentration bis 2000  $\mu\text{M}$  eine vermehrte Produktion an IL-2 feststellen konnten. Allerdings stimulierten sie Blut von gesunden Probanden und nicht von kardiochirurgischen Patienten, bei denen davon ausgegangen werden muss, dass die Zellen des Immunsystems bereits durch den Eingriff selbst und den Einsatz des CPB aktiviert sind.

Ob wie beschrieben auch in unserer Studie postoperativ IL-2 nur in verminderter Menge sezerniert wird (34, 56, 67), kann mit unserem Versuchsaufbau nicht eindeutig beantwortet werden, da wir die relative Anzahl an zytokinproduzierenden T-Zellen mit Hilfe fluoreszierender Antikörper und keine absoluten Plasmaspiegel bestimmt haben.

Der nachweisbare Anteil an intrazellulärem Zytokin ist in unstimuliertem Zustand häufig sehr gering. Durch die Aktivierung mit PMA und Ionomycin erhält man eine Aussage darüber, ob und wie viele der Zellen grundsätzlich stimulierbar und damit in ihrer Funktion unbeeinträchtigt sind. In der Studie von Naldini et al. (67) sinkt der IL-2 Spiegel im Plasma um beinahe die Hälfte von präoperativ 192 pg/ml auf 107 pg/ml innerhalb 24 Stunden nach Einsatz der HLM. Prinzipiell ist auch in unserer Studie eine verminderte Anzahl an IL-2 produzierenden Zellen in den ersten 24 Stunden zu messen, die in den folgenden Tagen wieder ansteigt. Jedoch fällt diese Reduzierung nicht in dem Umfang aus, dass dadurch das Ergebnis von Naldini et al. erklärt werden könnte. Auch durch die leicht verminderte Anzahl an Lymphozyten ist dieses Ergebnis nicht zu erklären (13, 67). Vermutlich sind beide Punkte, sowie eine eventuelle Verminderung in der Produktionsfähigkeit der zytokinproduzierenden T-Zellen, für eine verminderte IL-2 Synthese verantwortlich. Allerdings bleibt dies Spekulation und ist Ansatz für weitere Untersuchungen.

Als einziges ist in der ersten Terzile der IL-2 produzierenden T-Zellen ein deutlicher Effekt durch Glutamin erkennbar. In dieser Gruppe, die von Anfang an aus weniger IL-2 produzierenden T-Zellen bestand, zeigte sich ein Anstieg von der präoperativen zur postoperativen Messung und einem deutlich höheren Wert als in den beiden anderen Gruppen.

Warum aber gerade diese IL-2 schwache Gruppe von Glutamin zu profitieren scheint, wird hieraus allerdings nicht deutlich.

#### **4.4 Detektion von intrazellulärem IL-1, IL-8 und IL-10 bei stimulierten T-Lymphozyten**

Die Verwendung der HLM bei kardiochirurgischen Eingriffen kann zu einer Polarisierung der Immunantwort mit einer gesteigerten Th-2-Reaktion und einer verminderten Th-1-Reaktion führen (34, 56, 67, 77). Da aus einem veränderten Verhältnis der T-Zell-Subpopulationen auch ein verändertes Zytokinverhältnis resultiert, haben wir uns neben dem für die Th1-Zellen typischen IL-2 noch folgende Interleukine im perioperativen Verlauf betrachtet: IL-1, IL-8 und IL-10.

##### *4.4.1 Interleukin-1*

IL-1 ist ein proinflammatorisches Zytokin und kann von einer Vielzahl von Zellen sezerniert werden. Dazu gehören vor allem Monozyten/Makrophagen aber auch NK-Zellen, T- und B-Zellen (11, 38). IL-1 wird sehr früh im Krankheitsverlauf sezerniert und induziert die inflammatorische Kaskade. Dabei verstärkt es maßgeblich die lymphozytäre Reaktion, indem es die Th1-Zellen zur Freisetzung von IL-2 stimuliert und die B-Zellen zur Proliferation und Antikörpersynthese anregt (11, 38). Somit erfolgt die Induktion einer inflammatorischen Reaktion als Antwort auf eine Entzündung zu einem großen Teil durch IL-1. Außerdem induziert es die Sekretion anderer proinflammatorischer und chemotaktischer Zytokine, die ihrerseits die Anlockung und Aktivierung von Leukozyten bewirken (11).

Weiterhin stimuliert es die Synthese von Akut-Phase-Proteinen in der Leber und ist auf zentraler Ebene maßgeblich für die Entstehung von Fieber verantwortlich. Durch diese Effekte hat IL-1 eine protektive Wirkung gegen eine Vielzahl von Infektionen, vor allem bakterieller und parasitärer Genese (11, 38).

IL-2 wurde bereits in vielen Studien betrachtet, während über das Verhalten und die Veränderungen in der IL-1 Synthese im perioperativen Verlauf kardiochirurgischer Eingriffe verhältnismäßig wenig bekannt ist. Der Einsatz der HLM scheint die Produktion von IL-1 nur wenig zu beeinflussen. Postoperativ wurden keine wesentlichen Änderungen der Zytokinkonzentration von McBride et al. (59, 60) gemessen. Auch bei Naldini et al. (67) blieb die Konzentration an IL-1 im Plasma nach Stimulation mit PHA unverändert. Diese Ergebnisse lassen sich durch unsere Studie bestätigen, in der sich der Anteil an IL-1 produzierenden T-Lymphozyten nicht wesentlich verändert hat. Hingegen beobachteten Markewitz et al. eine

Verminderung der IL-1 Synthese bei peripheren mononukleären Zellen, die mit LPS stimuliert wurden. Eine Erholung trat über den gesamten Beobachtungszeitraum von einer Woche nicht ein (56).

Eine Erklärung für diese Beobachtungen kann hier nicht sicher abgegeben werden. Ein Zusammenhang ist möglicherweise darin zu sehen, dass die IL-1-Produktion sowohl durch die Interferone als auch durch bakterielle und virale Antigene induziert wird. Dies steht jedoch in Korrelation zu Infektionen und einer Th1-favorisierten Immunantwort, die in unserer Patientengruppe eher supprimiert ist.

#### *4.4.2 Interleukin-8*

IL-8 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und wird hauptsächlich von Makrophagen, zusammen mit IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , unmittelbar zu Beginn einer Entzündungsreaktion oder bei Gewebsschaden sezerniert. Aber auch aktivierte T-Zellen haben die Fähigkeit zur IL-8 Produktion. Als Stimulus zur IL-8 Synthese dienen IL-1, TNF- $\alpha$  und verschiedene virale und bakterielle Antigene (11, 39).

IL-8 hat im Vergleich zu anderen Zytokinen ein relativ enges Wirkungsspektrum. Es dient der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und hat zusätzlich eine hohe chemotaktische Potenz auf diese Zellen (39). Neutrophile Granulozyten reagieren aber nicht nur auf IL-8, sie haben unter bestimmten Umständen auch das Vermögen, dieses Zytokin zu synthetisieren. Es muss angenommen werden, dass diese Synthesefähigkeit bei Infektionen eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung hat, wenn die Neutrophilen einen Anteil von bis zu 70% der zirkulierenden Leukozyten ausmachen (11).

Eine lokale Entzündungsreaktion ist hauptsächlich durch das Einwandern der neutrophilen Granulozyten unter Rekrutierung von Monozyten geprägt. Die Endothelzellen beeinflussen die Leukozyten bei der Diapedese, indem sie ebenfalls die Fähigkeit besitzen, über die IL-8 Produktion chemotaktische Reize zu setzen (11).

In unserer Studie konnten wir unmittelbar postoperativ einen signifikanten Anstieg an IL-8 produzierenden T-Zellen in allen drei Gruppen nachweisen, der sich bis zum zweiten postoperativen Tag wieder auf den Ausgangswert einpendelte. Die Interpretation dieses Ergebnisses ist aufgrund des engen Wirkspektrums schwierig. Ob ein Zusammenhang zwischen der frühen postoperativen Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und den erhöhten IL-8 Werten zu sehen ist, bleibt spekulativ. Zu beobachten ist jedoch ein Anstieg der Neutrophilen in der direkten postoperativen Phase. Ebenso beschrieben McBride et al. (59) und

Finn et al. (20) eine unmittelbar postoperativ erhöhte Freisetzung von IL-8 bei kardiochirurgischen Patienten.

#### *4.4.3 Interleukin-10*

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin und wird im Rahmen der Polarisation der Th-2 Antwort zugeschrieben (77, 87). Seine Hauptaufgabe ist die Hemmung der proinflammatorischen Zytokinproduktion, wovon besonders die Zytokinantwort der Th1-Zellklone (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$ ) betroffen ist. Auf diesem Weg hat IL-10 einen großen Einfluss auf die Negativ- Regulation der inflammatorischen Antwort, die sonst vor allem durch verschiedene selbstverstärkende Mechanismen geprägt ist. Die inhibierende Wirkung auf die IFN- $\gamma$  Produktion der NK-Zellen ist ein weiterer Effekt in diesem Kontext (11, 40).

Eine Polarisation zugunsten der Th2-Zellen nach kardiochirurgischen Eingriffen konnten wir in unserer Untersuchung anhand einer gesteigerten Synthese von IL-10 bestätigen. Der Anteil der IL-10 produzierenden T-Zellen stieg zum ersten postoperativen Tag signifikant an. Eine erhöhte Synthese dieses Zytokins mit einem Maximum am ersten Tag konnten auch Naldini et al. (67) bei peripheren mononukleären Zellen nachweisen, die sie für 24 Stunden mit PHA stimuliert hatten. Hiesmayr et al. (34) haben sogar unmittelbar postoperativ den höchsten Serumspiegel an IL-10 im Plasma messen können.

### **4.5 Klinischer Verlauf und das Auftreten von Infektionen bei kardiochirurgischen Patienten unter Glutamin**

Glutamin wird, wie bereits einleitend erwähnt, als Substrat für eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen des Immunsystems benötigt. Aufgrund dieser Eigenschaft ist die Wirkungsweise von Glutamin im menschlichen Organismus unter anderem anhand von Laborparametern zu verifizieren. Für den klinisch praktizierenden Arzt scheint es jedoch bedeutsamer, den klinischen Verlauf zu betrachten und hier eventuelle Veränderungen mit biochemischen Ergebnissen in Verbindung zu bringen. Aus diesem Grund befassen sich viele Studien mit der Frage nach der genauen Wirkung von Glutamin auf Veränderungen klinischer Parameter. Beispielsweise kann anhand des Herzens, unter einer bestimmten Fragestellung die Wirkung von Glutamin auf ein einzelnes Organ betrachtet werden. In den Blickpunkt geraten dabei Patienten, die an Herzinsuffizienz oder Ischämie des Herzens erkrankt sind. Denn diese fallen dadurch auf, dass sie nach Operation unter Einsatz der HLM besonders häufig an langwierigen Komplikationen leiden. Gefürchtet ist das postoperative Pumpversagen, was auch die häufigste Todesursache innerhalb dieser Patientengruppe ausmacht (49). In diesem

Zusammenhang untersuchten Khogali et al. (46) die Wirkung von Glutamin auf das unter Ischämie arbeitende Rattenherz. Bei verminderter Koronarperfusion unter Normothermie sinkt die Glutaminkonzentration in der Herzmuskulatur um 60% ab. Des weiteren wurde unter ischämischen Bedingungen ein Pumpversagen des isoliert arbeitenden Herzen beobachtet. Das Herzzeitvolumen fiel ohne Glutamingabe innerhalb von 35 min von 46 ml/min auf 17 ml/min ab. Die Substitution von unterschiedlich hohen Glutaminmengen bewahrte das Herz vor diesem Leistungsabfall und verbesserte erheblich die postischämische Erholungsphase. Als optimale Glutaminkonzentration geben die Autoren hochnormale Werte von 2,5 mM an.

Bedeutsamer als Untersuchungen der direkten Wirkung von Glutamin auf das Herz sind in betracht auf den Inhalt unserer Studie Forschungsarbeiten, die sich ebenfalls mit dem Effekt von Glutamin auf das klinische Outcome und die Inzidenz von Infektionen befasst haben. Genau dies untersuchte Oudemans-van Straaten et al. (72) an 80 Patienten, die nicht elektiv auf die Intensivstation verlegt wurden. Dabei konnten sie erkennen, dass der Plasma-Glutamin-Spiegel sowohl bei älteren, als auch bei Patienten mit der Erstdiagnose Kreislaufschock, erniedrigt war. Außerdem war die Mortalität im Krankenhaus bei Patienten mit niedrigen Glutaminspiegeln signifikant erhöht. Aus dieser Studie geht zudem hervor, dass eine initial erhöhte Ausschüttung von Glutamin aus seinem Hauptspeicherort, der Skelettmuskulatur, für primär normale oder erhöhte Plasmaglutaminspiegel sorgen kann. Deshalb kann man bei normalen Werten nicht automatisch einen Glutaminmangel ausschließen. So steigt beispielsweise die Kreatininkinase (CK) nach Verletzung der Muskulatur (durch Trauma oder Ischämie) an. Dies ist assoziiert mit erhöhten Plasma-glutaminwerten und kann temporär einen Glutaminmangel verschleiern.

Wischmeyer et al. (100) untersuchten in einem Zeitraum von 30 Tagen die Wirkung von parenteral appliziertem Glutamin auf 26 Patienten mit schwersten Verbrennungen. In der Glutamingruppe nahm die Inzidenz der Bakteriämie mit Gram-negativen Keimen signifikant von 43% auf 8% ab. Außerdem traten Pneumonien und septische Episoden in der Versuchsgruppe wesentlich seltener auf. Die Autoren sahen in diesem Ergebnis die These bestätigt, dass durch die Applikation von Glutamin die Barrierefunktion des Darms besser funktioniert und ein Übertreten von vorwiegend Gram-negativen Bakterien in den Organismus stark eingeschränkt werden kann. In selbiger Studie war die Gesamtanzahl an Infektionen in der Glutamingruppe vermindert, was anhand des C-reaktiven Proteins (CRP) bestimmt wurde. Als Ursache beschreiben Wischmeyer et al. (100) zum einen die verminderte Anzahl an Gram-negativen Bakteriämien in dieser Gruppe und zum anderen einen direkten Effekt von Glutamin auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Houdijk et al. (35) in einer Studie an polytraumatisierten Patienten. Die Patienten der Versuchsgruppe erhielten zusätzlich zur enteralen Ernährung Glutamin. Die durchschnittliche Beatmungsdauer in Tagen und die Zeit des Krankenhausaufenthaltes unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Jedoch war die Anzahl an Bakteriämien, Pneumonien und septischen Episoden in der Glutamingruppe signifikant vermindert. Auffällig war auch hier der signifikante Unterschied an Infektionen mit Gram-negativen Keimen zwischen den Gruppen. Keiner der Patienten der Glutamingruppe erkrankte an einer Bakteriämie mit Gram-negativen Bakterien, während diese für 54% der Bakteriämien und 63% der Fälle von Sepsis in der Kontrollgruppe verantwortlich waren. Aus diesem Grund halten auch Houdijk et al. (35) die These der verbesserten Darmbarriere durch Glutamin für zutreffend und empfehlen die Applikation bei polytraumatisierten Patienten.

Goeters et al. (25) legten in einer Studie an 144 kritisch kranken Patienten einer chirurgischen Intensivstation den Fokus auf die Beobachtung der mittelfristigen Mortalitätsrate. Dabei konnten sie feststellen, dass sich die Sechsmonats-Überlebensrate mit 67% in der Glutamingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 40% signifikant besser darstellte. Allerdings konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen in der Akutphase nachgewiesen werden. Die Mortalität und die Aufenthaltslänge im Krankenhaus und auf der Intensivstation waren etwa gleich hoch. Auch konnte trotz parenteraler Applikation eine Erhöhung des Plasmaglutaminspiegels erst nach 6-9 Tagen nachgewiesen werden. Als Ursache dafür mag die eher niedrige Glutamindosis von 0,2 g/kg KG in Betracht gezogen werden.

In einer Untersuchung von Morlion et al. (64) an 28 Patienten mit elektiven abdominalchirurgischen Eingriffen verkürzte sich die Krankenhausaufenthaltsdauer von 21,7 Tagen um 6,2 Tage auf 15,5 Tage. Beim Betrachten des Verhaltens der Lymphozyten stellten sie am sechsten Tag in der Glutamingruppe eine signifikant höhere Anzahl von  $2,41 \times 10^6/\text{ml}$  im Vergleich zu  $1,52 \times 10^6/\text{ml}$  in der Kontrollgruppe fest.

Ebenso eine verkürzte Krankenhausliegezeit ( $11,7 \pm 2$  Tagen in der Kontrollgruppe,  $10,6 \pm 1,2$  Tage in der Glutamingruppe) konnten Yao et al. (101) in einer Studie an elektiven abdominalchirurgischen Eingriffen an 40 Patienten aufzeigen. Als eventuelle Erklärung dafür wurde untersucht, ob sich durch Glutamin Unterschiede im Plasmaendotoxinlevel zwischen den Gruppen darstellen lassen, was jedoch nicht bestätigt werden konnte. Allerdings war die Kapazität zur Inaktivierung von Plasmaendotoxinen in der Glutamingruppe erhöht. Die Autoren deuteten das Ergebnis als positiven Einfluss von Glutamin auf die postoperative Immunsuppression, ohne direkt eine Endotoxinämie zu beeinflussen.

Novak et al. (71) verglichen in einer Meta-Analyse 14 Studien miteinander, in denen Glutamin appliziert wurde. Daraus schlussfolgerten sie, dass Patienten durch eine verminderte Mortalitätsrate eher von parenteraler und hoch dosierter, als von enteraler und niedrig dosierter Glutamingabe profitierten. Im Vergleich der chirurgischen Patienten mit kritisch Kranken profitierten die Patienten der chirurgischen Intensivstation von Glutamin durch eine verminderte Anzahl an Komplikationen durch Infektionen sowie einer verkürzten Krankenhausaufenthaltsdauer. Allerdings war bei diesem Kollektiv keine Änderung bezüglich der Mortalität erkennbar. Bei den nicht chirurgisch kritisch Kranken hingegen führte die Gabe von Glutamin sowohl zu einer verminderten Anzahl an Infektionen als auch zu einer besseren Mortalitätsrate.

Auch D. Wilmore (99) konnte die verkürzte Aufenthaltsdauer nach dem Vergleich von sechs Studien an Patienten mit elektivchirurgischen Eingriffen bestätigen. Im Durchschnitt machte dies eine Verminderung von 17,1 auf 13,1 Tage aus, also ganze vier Tagen. Bei den Untersuchungen handelte es sich ausschließlich um elektive Eingriffe, wovon ein Großteil abdominalchirurgische Operationen ausmachten. Zwar wurde in allen Untersuchungen Glutamin intravenös zugeführt, jedoch ist die applizierte Dosis mit einer Spannweite von 0,18-0,4 g/kg/d recht unterschiedlich. Allerdings ist zu bemerken, dass in jeder einzelnen Untersuchung eine signifikante Reduktion der Krankenhausliegezeit erkennbar war, ohne dass dabei großen Abweichungen von dem Durchschnitt von vier Tagen vorkamen.

Zheng et al. (105) verglichen in einer Meta-Analyse 9 Studien großer abdominalchirurgischer Eingriffe miteinander. Die Patienten wurden postoperativ parenteral ernährt, wobei auch hier die Menge der Glutamingabe in den einzelnen Untersuchungen variierte von 0,18 - 0,5 g/kg/d. Unter Glutamingabe verminderte sich in den Untersuchungen die infektiöse Morbidität sowie die Krankenhausliegezeit.

In unserer Studie konnte durch die Applikation von Glutamin kein entscheidender Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Infektionsrate in der postoperativen Phase nachgewiesen werden. Insgesamt traten bei den 79 beobachteten Patienten 3 Fälle von Infektionen auf, zwei davon in der Kontrollgruppe und eine in der Glutamingruppe. Auch in der Menge der verabreichten Antibiotika, vier in der Glutamingruppe, eine in der Aminosäurengruppe und zwei in der Kontrollgruppe, war keine signifikante Differenz zwischen den drei Kollektiven zu verzeichnen. Bei genauerem Betrachten unserer Patienten, im Vergleich mit den Patientenkollektiven der zitierten Studien, bei denen sehr wohl signifikante Veränderungen beschrieben wurden, fällt folgendes auf:

Bei Wischmeyer et al. (100) und Houdijk et al. (35) profitierten hauptsächlich Patienten mit schwersten Verbrennungen beziehungsweise polytraumatisierte Patienten von Glutamin durch eine verminderte Anzahl an Infektionen vor allem durch Gram-negative Keime. Diese Patienten sind aufgrund ihrer Verletzungen zu einem hohen Grad durch Katabolie, Infektionen und ausgeprägter Inflammation gefährdet. Außerdem ist von einem längeren Aufenthalt auf der Intensivstation auszugehen, bei denen die Patienten über mehrere Tage keine oder nur in seltenen Fällen normale Nahrung zu sich nehmen. In dieser Phase ist also nicht nur mit einem höheren Umsatz an Glutamin zu rechnen, sondern auch mit einer verminderten Aufnahme dieser Aminosäure. Das ist selbst der Fall, wenn die intensiv-pflichtigen Patienten künstlich ernährt werden, da die verabreichten Nährstoffe oft nur wenig Glutamin enthalten. Außerdem werden bei Patienten, die längere Zeit auf einer Intensivstation verbringen, durch die erschwerte Grundsituation und zur Aufrechterhaltung der Funktion des Immunsystems die physiologischen Glutaminspeicher, wie Skelettmuskulatur oder Lunge, entleert.

Die durchschnittliche Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation betrug bei unseren Patienten 2,6 Tage (Glutamin), 2,2 Tage (Aminosäuren) und 2,0 Tage (NaCl) und ist damit relativ gering. Durch die schnelle Stabilisierung des Zustandes unserer Patienten war nach relativ kurzer Zeit eine vollständige Ernährung mit normaler Kost möglich, sodass sie ihren Glutaminbedarf selbstständig decken konnten. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass selbst die Personen unserer Kontrollgruppe nicht in einen so ausgeprägten Glutaminmangelzustand geraten sein dürften wie Verbrennungsoffer oder polytraumatisierte Patienten. Ein weiterer Unterschied zwischen unseren Patienten und denen von Wischmeyer et al. (100) und Houdijk et al. (35) ist darin zu sehen, dass wir zwar mit einer maximalen Lymphozytenzahl von 1,2 Giga/l bereits ein Kollektiv ausgewählt haben, das ebenfalls eine mögliche anerge Stoffwechsellaage aufweist, was mit einer erhöhten postoperativen Infektionsgefahr einhergeht, jedoch handelt es sich bei den durchgeführten kardiochirurgischen Operationen um elektive Eingriffe. Unsere Patienten wurden auf ihre Operationsfähigkeit hin untersucht und litten folglich nicht bereits präoperativ an Infektionserkrankungen oder befanden sich durch andere Umstände, wie Trauma, in einer ausgeprägten katabolen Stoffwechsellaage, was zu einer weiteren Schwächung der Immunlage geführt hätte.

Wie bereits erwähnt dient Glutamin unter anderem den Enterozyten als wichtiges Stoffwechselsubstrat. Bei einem Mangel an Glutamin im Rahmen eines katabolen Stoffwechselzustandes können die Zellen der Darmmukosa ihre Barrierefunktion zwischen dem Darmlumen und dem Körper nicht mehr voll ausüben. Somit kann es zu einem Übertreten von Toxinen und Bakterien aus dem Darm kommen (35, 54, 82). Diese These scheint sich in



den angesprochen Untersuchungen von Wischmeyer et al. (100) und Houdijk et al. (35) zu bestätigen. Dort entwickelte sich unter Glutamin eine Abnahme an Infektionen, die vor allem durch Gram-negative Bakterien verursacht werden. Jedoch wird nicht deutlich, ob es durch den Einfluss von Glutamin wirklich zu einem verminderten Übertreten von Bakterien aus dem Darmlumen kommt oder ob allein die Immunreaktion auf eindringende Keime effizienter funktioniert. Im Hinblick auf die Studie von Yao et al. (101) scheint die zweite Aussage wahrscheinlicher, da keine Unterschiede bezüglich des Plasmaendotoxin-spiegels zwischen den Gruppen gemessen werden konnten, jedoch die Kapazität zur Inaktivierung von Plasmaendotoxinen in der Glutamingruppe erhöht war.

Auch bei den chirurgischen Patienten der Meta-Analyse von Novak et al. (71) und Zheng et al. (105) sank die Anzahl der Infektionen. Es wurden in den betrachteten Untersuchungen fast ausschließlich abdominalchirurgische Eingriffe durchgeführt, die mit einem hohen Risiko an intraoperativen Bakteriämien einhergehen. Diese Patienten profitieren von Glutamin vor allem in zweierlei Punkten: Zur Unterstützung der Immunfunktion bei intraoperativer Bakteriämie und zur Prävention einer Glutaminmangelernährung, da auch dieses Patientenkollektiv meist mehrere Tage postoperativ keine normale Nahrung zu sich nehmen konnte. Diese beiden Punkte sind allerdings in dem Umfang bei unseren Patienten nicht der Fall. Jedoch kommen auch bei kardiochirurgischen Eingriffen Endotoxinämien relativ häufig vor, da die Mukosabarriere bei größeren Eingriffen und Traumen durch eine eingeschränkte Durchblutung nicht selten gestört wird, wodurch es zu einem Austreten von Bakterien und Toxinen aus dem Darmlumen kommen kann. Die bei kardiochirurgischen Eingriffen nachgewiesenen Bakteriämien und Endotoxinämien waren allerdings nur so gering, dass sich daraus keine Veränderungen oder Auswirkungen auf die regionale oder systemische Hämodynamik und metabolische Parameter ergeben haben (85). Warum jedoch die perioperativen Bakteriämien nur in so geringem Umfang auftraten und ohne Konsequenzen für den klinischen Verlauf geblieben sind, ist nicht eindeutig geklärt. Sicher ist jedoch, dass durch die perioperative Verabreichung einer glutaminhaltigen Lösung keine Veränderungen bezüglich der Quantität an Bakteriämien aufgetreten sind (85). Da die Dosis in dieser Studie mit 0,05 g/kg weit unter den angegebenen Empfehlungen lag, bleibt unklar, inwieweit ein eventuell bestandenes präoperatives Glutamindefizit durch diese Substitution überhaupt hätte korrigiert werden können.

Bezüglich der Dauer des Krankenhausaufenthaltes ist in unserer Studie kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen. Dies stimmt durchaus mit den Ergebnissen von Goeters et al. (25) und Houdijk et al. (35) überein. Ein Grund dafür könnte sein, dass es sich bei den

durchgeführten kardiochirurgischen Operationen um relativ häufig und routiniert durchgeführte Eingriffe handelt. Damit kann von einem möglichst kleinen operativen Trauma und möglichst kurzen Operationszeiten ausgegangen werden, was beides mit einer geringeren Anzahl an perioperativen Komplikationen verbunden ist. Dafür spricht auch die relativ kurze Krankenhausliegezeit unserer Patienten von 9,1 Tagen (Glutamin-, Aminosäurengruppe) und 9,2 Tagen (NaCl-Gruppe). Außerdem beeinflussen neben Infektionen noch andere Faktoren wie Komplikationen der Herz-Kreislauffunktion und des neurologischen Systems die Aufenthaltszeiten im Krankenhaus. Diese Punkte wurden aber weder in unserer noch in den zitierten Studien weiter berücksichtigt.

Eine Studie, die in Aufbau und Fragestellung unserer Untersuchung sehr ähnlich war, ist die Studie von Tepaske et al. (87). Sie wurde ebenfalls an einem Patientenkollektiv durchgeführt, das sich herzchirurgischen Eingriffen unterzog. Auch die Suche nach Veränderungen im klinischen Outcome und Unterschiede bezüglich peri- und postoperativ auftretender Infektionen gleicht unserer Fragestellung. Einschlusskriterien waren Alter über 70 Jahren oder Mitralklappenersatz oder Ejektionsfraktion unter 40%. Auch hinsichtlich Alter, Geschlechtsverteilung, Body Mass Index, linksventrikulärem enddiastolischem Druck und der Anzahl präoperativer Infarkte sind beide Studien durchaus miteinander vergleichbar. Allerdings erhielt die mit der Kontrollgruppe zu vergleichende Patientengruppe nicht Glutamin, sondern L-Arginin, mehrfach ungesättigte omega3-Fettsäuren und RNA. In der Kontrollgruppe wurde mit 54% eine erstaunlich hohe Infektionsrate beobachtet. Bei solch einem Ergebnis wundert es kaum, dass bei einer Infektionsrate von lediglich 17% in der Studiengruppe, ein statistisch signifikanter Unterschied vorliegt. Jedoch kommt die Frage auf, wodurch die Infektionsrate in der Kontrollgruppe so hoch war. Vor allem in Anbetracht dessen, dass diese in unserer Studie mit knapp 10% in der Kontrollgruppe sogar deutlich niedriger war als in der eigentlichen Versuchsgruppe von Tepaske et al. Doch wie kommt ein solch gravierender Unterschied in sonst so vergleichbaren Studien zustande? Entscheidende Parameter, die mit dem Auftreten postoperativer Komplikationen korrelieren und deshalb eine Erklärung liefern könnten, wie die Aortenabklemmzeit und die extrakorporale Perfusionszeit, sind in unserer Studie sogar tendenziell höher. Allerdings waren die Anzahl an Transfusionen (Erythrozytenkonzentrate, Frischplasmen, Thrombozytenkonzentrate), sowie die perioperative Flüssigkeitsbilanz in unserer Untersuchung niedriger. Einen eindeutigen Anhalt, der Aufschluss über diese Frage geben könnte, haben wir nicht finden können.

Im Vergleich zu einer vorliegenden Infektionsrate von 54% ist bei einer Infektionsrate von lediglich 10% wie in unserer Kontrollgruppe, eine signifikante Verminderung in der

Studiengruppe erheblich schwieriger nachzuweisen. In der Phase der Studienplanung lag die postoperative Infektionsrate über den von uns gemessenen 10%. In diesem Zeitraum war unter anderem auch eine erhöhte Anzahl an Sternuminfektionen zu verzeichnen. Was letztendlich dafür die Hauptursache war, bleibt spekulativ. Sicher ist jedoch, dass diese Phase ohne entscheidende Veränderungen des perioperativen Ablaufs plötzlich endete. Da sich unsere Untersuchungsepisode in einem Zeitraum befand, indem aus unserer Sicht relativ wenige perioperative Komplikationen auftraten, darf diskutiert werden, ob unser Stichprobenumfang für eine Infektionsrate von 10% genügend statistische Aussagekraft aufweist. Jedoch einen deutlich größeren Stichprobenumfang auszuwerten, der zur Klärung dieses Kritikpunktes nötig wäre, ist in einem realisierbaren Zeitraum einer monozentrischen Studie kaum möglich.

#### **4.6 Resümee**

Von mehreren Arbeitsgruppen wurde eine Polarisierung des Immunsystems mit einer Verlagerung des Verhältnisses der Th1/Th2-Zellen zugunsten der Th2-Zellen nach Einsatz der HLM beschrieben (34, 56, 59, 67). Auch wir konnten die für diese Veränderung der Immunfunktion typische Abnahme an IL-2 produzierenden, verbunden mit einer Zunahme an IL-10 produzierenden T-Zellen, nachweisen. Diese Polarisierung war in unserer Untersuchung in allen drei Gruppen zu sehen. Durch die Verabreichung von Glutamin konnten wir keine wesentlichen Unterschiede erkennen.

Die Suppression der Th1-vermittelten Immunantwort blieb in dieser Studie ohne Konsequenzen für den klinischen Verlauf und die Inzidenz von Infektionen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass diese Form der Polarisierung im Zusammenhang mit dem Einsatz der HLM als durchaus physiologisch anzusehen ist. Die HLM verursacht durch den Kontakt des Blutes mit einer künstlichen Oberfläche und die nicht physiologischen Fluss- und Druckverhältnisse verschiedene Probleme wie Hämolyse und Aktivierung und Verbrauch von Komplementfaktoren und Zellen des Immunsystems. Dadurch fallen große Mengen an Proteinen und anderen Abfallprodukten wie Zelltrümmer und andere Zellbestandteile an (73). Das Immunsystem steht mit der Entsorgung dieser Masse an Antigenen vor einer großen Herausforderung. Während die Th1-Zellen eher für eine Vermittlung der zellulären Immunantwort und die Abwehr von Infektionen verantwortlich sind (77, 87), ist es für die Elimination der meisten durch die extrakorporale Zirkulation anfallenden Produkte die Th2-vermittelte Antwort. Sie fördert eher die humorale Immunreaktion, indem sie unter anderem für die Aktivierung von B-Zellen verantwortlich ist (65, 66, 77, 88).

Wie bereits erwähnt ist diese physiologisch auftretende Form der Th2- geförderten Immunantwort durch ihr spezifisches Zytokinmuster für eine gewisse Unterdrückung der Th1- Immunantwort verantwortlich (34, 56, 67, 77). Aber auch diese Suppression eines Teil des Immunsystems als Reaktion auf die extrakorporale Zirkulation kann als durchaus physiologisch angesehen werden, da die Th1-Antwort für diese Form der Immunreaktion nicht benötigt wird. Außerdem scheint die Polarisation als Reaktion auf den Einsatz der HLM nur ein temporärer Zustand zu sein. Zumindest konnten wir am dritten postoperativen Tag eine weitestgehende Wiederherstellung der präoperativen Zellverhältnisse verzeichnen.

Die Th1-zellvermittelte Immunantwort ist maßgeblich an der Abwehr und Bekämpfung von Bakterien und Viren beteiligt. Aufgrund des Einsatzes der HLM und der damit verbundenen supprimierten Th1-Antwort, ist die Infektionsgefahr für den kardiochirurgischen Patienten besonders hoch (3, 59). Eine Unterstützung der Th1-Antwort und eine Stabilisierung der Produktion an IL-2 könnte bei einem Glutaminmangel durch eine Substitution dieser Aminosäure erfolgen. Diese Möglichkeit der Unterstützung der Immunfunktion durch Glutamin, konnten wir in unserer Studie allerdings weder labortechnisch noch klinisch nachweisen. Ein Grund dafür könnte sein, dass trotz der Auswahl eines Patientenkollektivs, das ein erhöhtes Risiko besitzt, postoperativ an Infektionen zu erkranken (42, 90), kein wirklicher Glutaminmangel vorlag und sich dieser auch im Verlauf nicht entwickelte. Als einziges ließ sich in der ersten Terzile der IL-2 produzierenden T-Lymphozyten ein positiver Effekt durch Glutamin erkennen, der im Rahmen eines Glutaminmangels noch ausgeprägter erscheinen dürfte.

Da sich in unserer Studie kein klinischer Vorteil für die Patienten abzeichnete, können wir einer generellen Glutaminsubstitution, obwohl auch bei uns keine Komplikationen aufgetreten sind (71), nicht prinzipiell zustimmen. Wahrscheinlich profitieren nur Patienten von der Substitution dieser Aminosäure, die auch an einem Glutaminmangel leiden. Diese Annahme lässt sich weiter festigen wenn man die Patientenkollektive genauer betrachtet, bei denen sich im klinischen Verlauf ein deutlich positiver Effekt durch Glutamin aufzeigen ließ (25, 35, 64, 71, 72, 99, 100, 105). Bei diesen Patienten muss aufgrund des Eingriffes beziehungsweise der Verletzungen sowohl von einem erhöhten Glutaminumsatz als auch aufgrund langer Liegezeiten und künstlicher Ernährung von einer verminderten Glutaminaufnahme ausgegangen werden.

Bei unseren kardiochirurgischen Patienten ist durch elektive, routiniert durchgeführte Eingriffe, kurzer Liegezeit und früher selbstständiger Ernährung in der Regel nicht mit einem Glutaminmangel zu rechnen. Dennoch ist es denkbar, auch bei diesen Patienten ein Kollektiv

zu definieren, das von Glutamin profitieren könnte. Dies wären am ehesten Patienten, die bereits präoperativ an einem Glutaminmangel leiden. Um diese zu erkennen, wäre allerdings ein entsprechendes präoperatives „Screening“ notwendig. Dazu müsste aber erst genau definiert werden, anhand welcher Parameter dieses „Screening“ aussagekräftig durchgeführt werden könnte. Eine reine Bestimmung des Plasma-Glutamin-Spiegels würde zur Erkennung eines Glutaminmangels nicht ausreichen, da dieser auf Kosten der Glutaminspeicher relativ lange konstant gehalten werden kann (82).

Dies ist aber nicht die einzige Frage, die noch zu klären ist. In weiteren Untersuchungen sollte noch mehr Wissen darüber gewonnen werden, in welcher Menge eine eventuelle Glutaminsubstitution erfolgen sollte. Zwar konnten von einigen Forschungsgruppen Unterschiede unter steigender Glutaminkonzentration in vitro bezüglich der Zytokinproduktion aufgezeigt werden, jedoch unterscheiden sich diese teilweise erheblich in ihrer Aussage über die optimale Konzentration. Außerdem sind diese Ergebnisse auch nur unter Vorbehalt auf die Situation in vivo übertragbar (9, 48, 102).

Aber auch über die Substitutionsmenge bei Patienten sind unterschiedliche Angaben gemacht worden. P. Fürst (23) empfiehlt eine Mindesttagesdosis von 13-20g bei Patienten mit großem Trauma, Kachexie oder unkomplizierten elektiven Eingriffen. Er vermutet aber, dass Patienten mit Polytrauma, Sepsis, SIRS oder Verbrennungen vermutlich höhere Dosen benötigen. In den Metaanalysen von Wilmore (99) und Zheng et al. (105) an Patienten mit abdominalchirurgischen Eingriffen reicht die Spannweite der Glutamingabe von 0,18- 0,4 g/kg KG pro Tag beziehungsweise 0,18- 0,5 g/kg KG pro Tag. Trotz dieser unterschiedlichen Mengen werden aber durchaus vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Es ist nicht geklärt, ob es sich bei diesen Mengen um ausreichend hohe Dosen handelt. Für weitere Untersuchungen bleibt auch noch die Frage offen, ob unterschiedlich hohe Mengen bei unterschiedlichen Erkrankungen benötigt werden. Reicht es aus, wenn Glutamin erst bei einem Mangel substituiert wird? Oder sollte es bereits bei einem bestehenden Risikopotential prophylaktisch zugeführt werden? Welche Applikationsweise zeigt sich als vorteilhafter? Ist der enterale Weg zur Erhaltung der Darmbarriere und zur Verhinderung von Infektionen mit Gram-negativen Bakterien für Patienten mit einem derartigen Risikoprofil von Vorteil? Sollte bei der enteralen Gabe Glutamin eher in der Dipeptid-Form zugeführt werden oder besser proteingebunden vorliegen?

An diesen Fragen ist zu erkennen, dass trotz vieler Studien, die einen eindeutigen Vorteil für bestimmte Patientenkollektive durch Glutamin erkennen ließen, noch keineswegs Klarheit herrscht und somit weitere Untersuchungen notwendig sind.

#### 4.7 Zusammenfassung

Glutamin ist die im menschlichen Körper in freier Form am häufigsten vorkommende Aminosäure. Vor allem immunkompetente Zellen benötigen Glutamin als Substrat für ihren Stoffwechsel. Dieser Bedarf ist im Zustand der Aktivierung deutlich erhöht. Bei kardiochirurgischen Patienten kommt es durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine nicht nur zu einer generellen Aktivierung des Immunsystems, sondern auch zu einer Polarisierung der Th1/Th2-Immunantwort zugunsten der Th2-Zellen. Dadurch verändert sich ebenfalls das Zytokinmuster mit einer verminderten Produktion an IL-2 und einer gesteigerten IL-10 Synthese. Diese Polarisierung zu Lasten der Th1-Zell-gesteuerten Immunantwort hat durchaus eine klinische Bedeutung, da sie mit einer Immunsuppression einher geht und somit einen Einfluss auf die infektiöse Morbidität nimmt.

Ziel dieser Untersuchung war es, zu prüfen, ob durch die perioperative Verabreichung von Glutamin bei Patienten, die sich einem herzchirurgischen Eingriff unterziehen, die infektiöse Morbidität reduziert und die Funktion der Lymphozyten aufrecht erhalten werden kann. Als Hauptzielkriterien definierten wir die Beobachtung von Veränderungen in der Anzahl an IL-2 produzierenden T-Lymphozyten und der Infektionsrate. Als Nebenzielkriterien schauten wir auf Veränderungen der Anzahl an T-Zellen, die die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-8, beziehungsweise das antiinflammatorische Zytokin IL-10 synthetisierten und auf Veränderungen des Plasma-Glutamin-Spiegels.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden 79 Patienten randomisiert in drei Gruppen eingeteilt. Als Einschlusskriterien waren definiert: Patienten zur elektiven Herzchirurgie mit extrakorporaler Zirkulation, Ejektionsfraktion  $\leq 40\%$  oder Alter  $\geq 70$  Jahre und eine Lymphozytenzahl unter  $1200/\text{mm}^3$ . Letzteres sollte der Auswahl eines Patientenkollektivs mit eingeschränkter Immunkompetenz und potentieller Mangelernährung dienen.

Die Substitution erfolgte parenteral bis zum zweiten postoperativen Tag und wurde nach folgender Dosierung durchgeführt:

Glutamin-Gruppe:	0,735 g/kg L-Alanyl-L-Glutamin (=0,5 g/kg Glutamin) plus 0,1 g/kg standardisierte Aminosäurelösung plus 0,4 g/kg Glukose ad 1000 ml NaCl 0,9%
Aminosäuren-Gruppe:	0,835 g/kg standardisierte Aminosäurelösung plus 0,4 g/kg Glukose ad 1000 ml NaCl 0,9%
NaCl-Gruppe:	1000 ml NaCl 0,9%

Durch die perioperative Infusion von Glutamin konnten wir keine Verminderung der Anzahl an Infektionen bei unseren Patienten nachweisen. Ebenso zeigte sich keine Veränderung der Intensiv- und Krankenhausliegezeit, sowie der Mortalität. Allerdings muss dabei erwähnt werden, dass die Infektionsrate in der Kontrollgruppe mit 10% bereits als vergleichsweise sehr gering anzusehen ist. Die Patienten, die von Glutamin mit einer Verbesserung der angegebenen klinischen Parameter profitierten, waren Patienten, mit großflächigen Verbrennungen, abdominalchirurgischen Eingriffen oder kritisch Kranke. Diese Kollektive sind per se einem höheren Risiko ausgesetzt, an Infektionen zu erkranken. Des weiteren ist davon auszugehen, dass diese Gruppen durch die ursprüngliche Erkrankung oder die Traumagröße einen erhöhten Glutaminbedarf haben, oftmals in Verbindung mit einem verminderten Angebot durch künstliche Ernährung. Aufgrund komplikationsloser elektiver Eingriffe waren die meisten unserer Patienten bereits am ersten Tag wieder zur selbstständigen Nahrungsaufnahme fähig und in Verbindung mit der niedrigen Anzahl an perioperativen Infektionen ist der fehlende Nachweis eines positiven Einflusses durch Glutamin nicht verwunderlich.

Auch bezüglich einer Veränderung des produzierten Zytokinmusters konnten wir keine Veränderungen durch Glutamin nachweisen. Wir stimulierten T-Lymphozyten im Vollblut mit Ionomycin und PMA für acht Stunden und verhinderten mit Hilfe von Brefeldin A, dass die in dieser Zeit produzierten Proteine (Zytokine) nach extrazellulär transportiert wurden. Darauf folgte die Markierung der intrazellulären Zytokine mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern. Im Durchflusszytometer konnte dann der Anteil an T-Lymphozyten bestimmt werden, der ein bestimmtes Interleukin produziert hat.

Wir konnten eine Polarisation der Immunantwort der T-Zellen zugunsten einer Th2-Zellen favorisierten Antwort mit einer erhöhten Anzahl an IL-10 produzierenden und einer verminderten Anzahl an IL-2 produzierenden T-Zellen erkennen. Die gesteigerte Th2-Antwort ist in diesem Fall allerdings als physiologisch anzusehen, da sie für die Beseitigung der durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine anfallenden Zelltrümmer und anderer Proteine benötigt wird. Ebenso physiologisch ist eine damit verbundene Suppression der Th1-Antwort, da diese weniger gebraucht wird. Problematisch kann dieser Zustand der Polarisation dann werden, wenn es zu einer Infektion kommt, da für deren Abwehr eine eher Th1-Zellen gesteuerte Immunantwort nötig ist. Im Falle eines Glutamindefizits kann durch die Applikation dieser Aminosäure eine Stabilisierung der IL-2 Produktion und der damit verbundenen Th1-Antwort erreicht werden.

In dieser Studie konnte durch Glutamin keine Veränderung des Polarisationsverhältnisses der Th1/Th2-Zellen durch eine veränderte Anzahl an IL-2 beziehungsweise IL-10 produzierenden

Zellen nachgewiesen werden. Auch bei den IL-1 und IL-8 synthetisierenden T-Zellen konnten wir keine Veränderung durch Glutamin aufzeigen. Lediglich in der ersten Terzile der T-Zellen, die per se wenig IL-2 produzierten, zeigte sich durch Glutamin eine erhöhte Anzahl interleukinproduzierender T-Zellen.

Mit diesem Ergebnis kann einer generellen Befürwortung der Glutaminsupplementierung für kardiochirurgische Patienten nicht zugesprochen werden. Es scheinen nur die Patienten von einer Glutaminzufuhr zu profitieren, die einen akuten Mangel haben oder diesen erleiden werden. Um dieses Patientenkollektiv aus der Gruppe der kardiochirurgischen Patienten zu selektieren, wäre ein präoperatives „Screening“ auf einen potentiellen Glutaminmangel notwendig.

#### **4.8 Summary**

In the human body, glutamine is the most abundant free form amino acid. Immune competent cells utilize glutamine as a substrate for metabolism. This phenomenon increases during states of cellular activation. Using a cardiopulmonary bypass for patients undergoing cardiac surgery leads to a general activation of the immune system and to polarization of the Th1/Th2 immune-response in favor of the Th2-cells. Thereby cytokine-patterns change with decreased production of IL-2 and increased synthesis of IL-10. This polarization takes influence on the infectious morbidity by causing an immuno suppression.

This investigation intends to evaluate the infectious morbidity and the function of lymphocytes by the perioperative application of glutamine to patients who undergo cardiac surgical intervention. The observation of changes in amount of IL-2 producing T-lymphocytes and the infectivity were defined as main criteria. As a secondary objective, we monitored changes in the number of T-cells that produce pro-inflammatory cytokines IL-1 and IL-8 and the anti-inflammatory cytokine IL-10, respectively and changes in the level of plasma glutamine.

Seventy-nine patients were randomized into three groups. Criteria for inclusion into this study were: patients undergoing elective cardiac surgery including extra-corporal blood circulation; ejection fraction  $\leq 40\%$  or age  $\geq 70$  years; and a number of lymphocytes below  $1200/\text{mm}^3$ . The last criteria attempts to find a patient cohort with restricted immune-competency and potential malnutrition.

The amino acids were initially intravenously introduced once pre-operative; once post-operative and one dosage was administered daily for three days after surgery. The dosage amounts are given below:



Glutamine-Group:	0.735 g/kg L-alanyl-L-glutamine (=0,5 g/kg glutamine) plus 0.1 g/kg standardized amino-acid-solution plus 0.4 g/kg glucose ad 1000 ml NaCl 0,9%
Amino-Acid-Group :	0.835 g/kg standardized amino-acid-solution plus 0.4 g/kg glucose ad 1000 ml NaCl 0.9%
NaCl-Group:	1000 ml NaCl 0.9%

After perioperative infusion of glutamine, we did not detect a decrease in the incidence of infections in our patients. There was also no detectable change in ICU length of stay, in-patient days, nor mortality rate. Attention must be brought to the fact that the rate of infection in our control group was comparatively very low (10%) as opposed to similar studies. The patients who greatly benefited from glutamine infusion, measured by improvement of the quoted clinical parameter, were the ones with extensive burns, abdominal-surgical-inventions or critical illness. The subjects are notwithstanding exposed to a higher risk of severe illness from infections. Furthermore, those groups presumably have an increased need for glutamine stemming from primary disease and/or size of trauma. These circumstances often accompany a reduced supply of glutamine due to artificial nutrition. As a result of minimal complications in elective interventions, most of our patients were able to digest independently. In addition to the low incidence of perioperative infections, it is not surprising that this study did not yield a positive response to glutamine infusion.

Moreover regarding the produced cytokine pattern, we did not detect any measurable changes from glutamine. We activated T-lymphocytes in whole blood with Ionomycine and PMA for eight hours. Brefeldin A prevents excretion of any proteins produced in that period of time from being transported to the extracellular space. Thereafter, the intracellular cytokines were marked with specific fluorescing antibodies. The proportion of T-Lymphocytes that produced each detected cytokine was determined with flow cytometry.

We identified polarization of the immune response of the T-cells that benefited Th2-cell favored response with an increased amount of IL-10 producing cells and a decreased number of IL-2 synthesizing T-cells. The augmented Th-2 response needs to be categorized as physiologically in this case since it is necessary for the elimination of cell-debris and other proteins accumulated by using the cardiopulmonary bypass. Suppression of the Th1-response is similarly physiological since it is less needed. This state of polarization may become problematic when an infection occurs that requires Th1-cell controlled immunological

response. In case of glutamine deficiency, stabilization of the IL-2 production and the subsequent related Th-1 response can be reached through application of glutamine.

The results of this research yielded no detectable change in the polarization of Th1/Th2-cells through adjustment of the number of IL-2 or IL-10 producing cells. Glutamine inclusion did not produce any significant changes in IL-1 or IL-8 producing cells either. However in the first tertile of the T-cells that produce low IL-2, an increased amount of interleukin producing T-cells was seen.

A general application of glutamine in cardiac surgical patients can not be supported with these results. It seems that patients who already suffer from an acute glutamine deficiency or patients who will develop this deficiency benefit from a supply of glutamine. A preoperative screening of potential glutamine deficiency would be necessary in order to select this group out of the collective of patients undergoing cardiac surgery.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Ardawi MSM, Newsholme EA (2001): Glutamine metabolism in the lymphocytes of the rat. *Biochem J* 212: 835-842
2. Asemussen AM, Nagorsen D, Keilholz U, Letsch A, Schmitten A, Thiel E, Scheibenbogen C (2001): Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN $\gamma$  for the qualification of antigen reactive T-cells. *J Immunol Methods* 251: 101-8
3. Bacchetta MD, Ko W, Girardi LN, Mack CA, Krieger KH, Isom W, Lee LY (2003), Outcome of cardiac surgery in nonagenarians: a 10-year experience. *Ann Thorac Surg* 75: 1215-20
4. Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP, et al.: A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987; 317: 653-58
5. Bortz J (1993): Statistik für Sozialwissenschaftler, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
6. Brand K, Fekl W, von Hintzenstern J, Langer K, Lupp P, Schoerner C (1989): Metabolism of glutamine in lymphocytes. *Metabolism (Suppl. 1)* 38: 29
7. Cabioglu N, Bilgic S, Deniz G, Aktas E, Seyhun Y, Turna A, Gunay K, Esen F (2002): Decreased cytokine expression in peripheral blood leukocytes of patients with severe sepsis. *Arch Surg* 137: 1037-43
8. Carter LL, Swain SL (1997): Single cell analyses of cytokine production. *Curr Opin Immunol* 9: 177-82
9. Chang WK, Yang KD, Shaio MF (1999): Effect of Glutamine on Th1 and Th2 Cytokine Response of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Clin Imm* 93: 294-301
10. Chang WK, Yang KD, Chuang H, Jan JT, Shaio MF (2002): Glutamine protects activated human t-cells from apoptosis by up-regulating glutathione and bcl-2 levels. *Clin Immunol* 104: 151-60
11. Curfs JHAJ, Meis JFGM, Hoogkamp-Korstanje JAA (1997): A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Reviews* 10: 742-80
12. Darcy-Vrillon B, Posho L, Morel MT, Bernard F, Blanchier F, Meslin JC, Duee PH (1994): Glucose, galactose and glutamine metabolism in pig isolated enterocytes during development. *Pediatr Res* 36: 175
13. De Angeli S, Paccagnella A, Mordacchini M, Frugoni M, Zanardo G, Turolla L, Calo MA, Rosi P, Nieri A, Simini G (1994): The effects of prolonged cardiopulmonary bypass on cell-mediated immunity. *Thorac Cardiovasc Surg* 42: 14-20

14. Decker D, Schondorf M, Bidlingmaier F, Hirner A, Rücker AA von (1996): Surgical stress induces a shift in the type-1/ type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody –mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery* 119: 316-25
15. Deferrari G, Garibotto G, Robaudo C, Saffioti S, Russo R, Sala MR, Bruzzone M, Tizianello A, (1994): Renal ammoniagenesis and interorgan flow of glutamine in chronic metabolic acidosis. *Contrib Nephrol* 110: 144
16. de Leeuw (2002): *Statistics: The Study of Stability in Variation*, UCLA Statistics Testbook
17. Denno R, Rounds JD, Faris R, Holejko LB, Wilmore DW (1995): Glutamine-enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state. *J Surg Res* 61, 35-38
18. Dominioni L, Dionigi R, Zanella M (1987): Sepsis score and acute-phase protein response as predictors of outcome in septic surgical patients. *Arch Surg* 122: 141-6
19. Dufner, Jensen, Schumacher (1992): *Statistik mit SAS*, Teubner Verlag Stuttgart: 155ff
20. Finn A, Naik S, Klein N, Levinsky RJ, Strobel S, Elliott M (1993): Interleukine-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 105: 234-41
21. Fish J, Sporay G, Becker K (1997): A prospective randomized study of glutamine-enriched parenteral nutrition compared with enteral feeding in postoperative patients. *Am J Clin Nutr* 65: 977-985
22. Fransen E, Maessen J, Dentener M, Senden N, Buurman W (1999): Impact of blood transfusions on inflammatory mediator release in patients undergoing cardiac surgery. *Chest* 116: 1233-9
23. Fürst P (2001): New Developments in Glutamine Delivery. *J Nutr* 131: 2562S-8
24. Fürst P, Albers S, Stehle P (1990): Glutamine-containing dipeptides in parenteral nutrition. *J Parenter Enteral Nutr* 14: 118S-24S
25. Goeters C, Wenn A, Mertes N, Wempe C, Aken H van, Stehle P, Bone HG (2002): Parenteral L-alanine-L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. *Crit Care Med* 30: 2032-37
26. Greten H, Herrmann R, Tichelli A, Drings P (2002): In: Greten H (Hrsg.) *Innere Medizin*, 11. Aufl. 934-66, Thieme Verlag Stuttgart New York
27. Griffiths RD (1998): Nutrition and survival in intensive care. *Intensivmed* 35: 3-9
28. Hammarqvist F, Werneman J, Ali R, Decker A von der, Vinnars E (1989): Addition of glutamine to parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann Surg* 209: 455-461

29. Hammerschmidt DE, Stroncek DF, Bowers TK (1981): Complement activation and neutropenia occurring during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 81: 370-7
30. Henriques V, Anderson AC (1913): Über parenterale Ernährung durch intravenöse Injektion. *Z Physiol Chem* 88: 357- 69
31. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthelen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B (1997): Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 65: 2283-91
32. Heyland DK, Cook DJ, Guyatt GH (1993): Enteral nutrition in the critical-ill patient: a critical review over the evidence. *Intens Care Med* 19: 435-42
33. Hiesmayr MJ, Spittler A, Lassnigg A, Berger R, Laufer G, Kocher A, Artemiou O, Boltz-Nitulescu G, Roth E (1999) Alterations in the number of circulating leucocytes, phenotype of monocyte and cytokine production in patients undergoing cardiothoracic surgery. *Clin Exp Immunol* 115: 315-23
34. Hisatomi K, Isomura T, Kawara T, Yamashita M, Hirano A, Yoshida H, Eriguchi N, Kosuga K, Ohishi K (1989): Changes in lymphocyte subsets, mitogen responsiveness, and interleukin-2 production after cardiac operations. *Thorac Cardiovasc Surg* 98: 580-91
35. Houdijk APJ, Rijnsburger ER, Jansen J, Wesdorp RIC, Weiss JK, McCamish MA, Teerlink T, Meuwissen SGM, Haarman HJTM, Thijs LG, Leeuwen PAM van (1998): Randomized trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet* 352: 772-76
36. Hulsewé KWE, van Acker BAC, von Meyenfeld MF, Soeters PB (1999): Nutrition depletion and dietary manipulation: effects on the immune response. *World J Surg* 23: 536-44
37. Ibelgaufts H: Cytokine Online Pathfinder Encyclopaedia- Cytokines-  
[www.copewithcytokines.de/cope.cgi?002632](http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?002632) (8.April.2002)
38. Ibelgaufts H: Cytokine Online Pathfinder Encyclopaedia-IL1-  
[www.copewithcytikines.de/cope.cgi?5009](http://www.copewithcytikines.de/cope.cgi?5009) (8.April.2002)
39. Ibelgaufts H: Cytokine Online Pathfinder Encyclopaedia- IL8-  
[www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5123](http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5123) (8.April.2002)
40. Ibelgaufts H: Cytokine Online Pathfinder Encyclopaedia- IL10-  
[www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5125](http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5125) (8.April.2002)
41. Jensen GL, Miller RH, Talabiska DG, Fish J, Gianferante L (1996): A double-blind, prospective, randomized study of glutamine-enriched compared with standard peptide-based feeding in critically ill patients. *Am J Clin Nutr* 64: 615-21
42. Jensen TG, Long JM, Dudrick SJ, Johnston DA (1985): Nutritional assessment indications of postburn complications. *J Am Diet Assoc* 85: 68-72

43. Kayser FH, Zinkernagel RM (2001): Grundlagen der Immunologie. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie, 10. Ausg., 47-152, Thieme Verlag, Stuttgart New York
44. Keller GA, Barke R, Harty JT, Humphrey E, Simmons RL (1983): Decreased hepatic glutathione levels in septic shock. Arch Surg 120: 941
45. Kew S, Wells SM, Yaqoob P, Wallace FA, Miles EA, Calder PC (1999): Dietary glutamine enhances T-lymphocyte responsiveness. J Nutr 129: 1524-31
46. Khogali SEO, Harper A, Lyall JA, Rennie MJ (1998): Effects of l-glutamine on postischaemic cardiac function: protection and rescue. J Mol Cell Cardiol 30: 819-27
47. Kilger E, Weis F, Briegel J, Frey L, Goetz AE, Reuter D, Nagy A, Schuetz A, Lamm P, Knoll A, Peter K (2003): Stress doses of hydrocortisone reduces severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery. Crit Care Med 31: 1068-74
48. Kircher B, Eibl G, Enrich B, Lätzer K, Herold M, Niederwieser D (2002): The role of l-alanyl-l-glutamine in the immune response in vitro. Wien Klin Wochenschr 114/15-16: 702-8
49. Korvald C, Elevenes OP, Myrnes T, Sørli DG (2001): Cardiac dysfunction and inefficiency after substrate-enriched warm blood cardioplegia. Euro J Cardio-Thor Surg 20: 555-64
50. Kress HG, Gehrsitz P, Elert O (1987): Predictive value of skin testing, neutrophil migration and C-reactive protein for postoperative infection in cardiopulmonary bypass patients. Acta Anaesthesiol Scand 31: 397-404
51. Kress HG, Scheidewig C, Schmidt H, Silber R (1999): Reduced incidence of postoperative infection after intravenous administration of an immunoglobulin A- and immunoglobulin M-enriched preparation in anergic patients undergoing cardiac surgery. Crit Care Med 27(7): 1281-7
52. Lacy JM, Wilmore DW (1990): Is Glutamine a conditionally essential amino acid? Nutr Rev 48: 297-309
53. Lawin P, Opderbecke HW, Schuster HP (1999): Die geschichtliche Entwicklung der Intensivmedizin in Deutschland. Anaesthesist 48: 827-37
54. MacFie J, McNaught C (2002): Glutamine and gut barrier function. Nutrition 18: 433-4
55. Mangano CM, Diamondstone LS, Ramsay JG, Aggarwal A, Herskowitz A, Mangano DT (1998): Renal dysfunction after myocardial revascularization: Risk factors, adverse outcomes, and hospital utilization. Ann Intern Med 128: 194-203
56. Markewitz A, Faist E, Lang S, Endres S, Fuchs D, Reichart B (1993): Successful restoration of cell-mediated immune response after cardiopulmonary bypass by immunomodulation. J Thorac Cardiovasc Surg 105: 15-24

57. Marshall JC, Christou NV, Horn R (1988): The microbiology of multiple organ failure: The proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens. *Arch Surg* 123: 309-15
58. Martinez-Pellus AE, Merino P, Bru M, Canovas J, Seller G, Sapina J, Fuentes T, Moro J (1997): Endogenous endotoxemia of intestinal origine during cardiopulmonary bypass. *Intens Care Med* 23: 1251-7
59. McBride WT, Armstrong MA, Crockard AD, McMurray TJ, Rea JM (1995): Cytokine balance and immunosuppressive changes at cardiac surgery: Contrasting response between patients and isolated CPB circuits. *B J Anaesth* 75: 724-33
60. McBride WT, McBride SJ (1998): The balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in cardiac surgery. *Curr Opin Anaesth* 11: 15-22
61. McNerlan SE, Rea IM, Alexander HD (2002): A whole blood method for measurement of intracellular TNF-alpha, IFN-gamma and IL-2 expression in stimulated CD3+ lymphocytes: differences between young and elderly subjects. *Exp Gerontol* 37: 227-34
62. Meister A, Anderson MA (1983): Glutathion. *Annu Rev Biochem* 52: 711
63. Menges T, Engel J, Welter I, Wagner RM, Little S, Ruwoldt R, Wollbrueck M, Hempelmann G. (1999): Changes in blood lymphocyte population after multiple trauma: association with posttraumatic complications. *Crit Care Med* 27: 733-40
64. Morlion BJ, Stehle P, Wachtler P, Siedhoff H-P, Köller M, König W, Fürst P, Puchstein C (1998): Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery. *Ann Surg* 227: 302-8
65. Mosmann TR, Coffman RL (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-73
66. Murray JS, Madri J, Pasqualini T, Bottomly K (1993): Functional CD4 T cell subset interplay in an intact immune system. *J Immunol* 150: 4270-6
67. Naldini A, Borrelli E, Carraro F, Giomarelli P, Toscano M (1999): Interleukin 10 Production in patients undergoing cardiopulmonary bypass: evidence of inhibition oh Th-1-type responses. *Cytokine* 11: 74-9
68. Naldini A, Borrelli E, Cesari S, Giomarelli P, Toscano M (1995): In vitro cytokine production and t-cell proliferation in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Cytokine* 7: 165-70
69. Newsholme EA, Billings P (1990): Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. *J Parenter Enter Nutr* 14: 63S
70. Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R (2002): Glutamine and glutamate- their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* 2003; 21: 1-9.

71. Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X (2002): Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med* 30: 2022-29
72. Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, Treskes M, Spoel HJI van der, Zandstra DF (2001): Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Int Care Med* 27: 84-90
73. Paparella D, Yau TM, Young E (2002): Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. *Europ J Cardio-Thorac Surg* 21: 232-44
74. Puyana JC, Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Silva WE, Miller CL (1998): Both T-helper-1-and T-helper-2-type lymphokines are depressed in posttrauma anergy. *J Trauma* 44: discussion 1045-46
75. Reichard SM, Bailey NM, Galvin MJ (1981): Alterations in tissue glutathione levels following traumatic shock. *Adv Shock Res* 5: 37
76. Rhode T, MacLean DA, Pedersen K (1996): Glutamin, lymphocyte proliferation and cytokine production. *Scand J Immunol* 44: 648-50
77. Romagnini S (1997): The Th1/Th2 paradigm. *J Immunol Today* 18: 263-6
78. Rose WC (1934): The significance of amino acids in the nutrition. *Harvey Lect* 30: 49-65
79. Roth E, Karner J, Ollenschlager G (1990): Glutamine, an anabolic effector? *J Parenter Enteral Nutr* 14: 130S-6S
80. Siegenthaler W (2001): *Klinische Pathophysiologie*, 8.Aufl., Thieme Verlag Stuttgart New York: 489-561
81. Shohl AT, Blackfan AD (1940): Intravenous administration of crystalline amino acids to infants *J Nutr* 20: 305- 16
82. Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW (1985): Glutamine metabolism by the intestinal tract. *J Parenter Enteral Nutr* 9: 608
83. Steinau F, Deja M, Wolf S, Busch T, Kaiser U (2002): Stellenwert immunnutritiver enteraler Ernährung in der Intensivmedizin. *Anaesthesist* 51: 843-52
84. Stevens J (1992): *Applied Multivariate Statistics for the Social Science*. Lawrence Erlbaum New Jersey: 448ff
85. Sucher U (2002): Enterale Immunonutrition: wann, für wen, welche Zukunftsperspektiven gibt es? *Aktuel Ernaehr Med* 27: 205-15
86. Suojaranta-Ylinen R, Ruokonen E, Pulkki K, Mertsola J, Takala J (1997): Preoperative glutamine loading does not prevent endotoxemia in cardiac surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 41: 385-91



87. Tepaske R, Velthuis H, Oudemans-van Straaten HM, Heisterkamp SH, van Deventer SJ, Eysman L, Kesecioglu J (2001): Effect of preoperative oral immune-enhancing nutritional supplement on patients at high risk of infection after cardiac surgery: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 358: 696-701
88. Thiel (2000): Inflammation und Immunparalyse. *Anaesthesist* 49: 466-71
89. Truneh A, Albert F, Golstein P, Schmitt-Verhulst AM (1985): Early steps of lymphocyte activation bypass by synergy  $\text{Ca}^{2+}$  ionophores and phorbol ester. *Nature* 313: 318-20
90. Ulrich F, Johnson WC, Rudders RA (1985): Cutaneous delayed hypersensitivity, T-cell subsets, and IL-2 secretion in patients with peripheral vascular disease. *J Clin Lab Immunol* 18: 107-12
91. Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S, (1998): Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* 26: 1793-1800
92. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, de Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S (1996): The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intens Care Med* 22: 707-10
93. Vinnars E, Bergström J, Fürst P (1975): Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue. *Ann Surg* 182: 665
94. Volk HD, Reinke P, Döcke WD (1999): Immunological monitoring of the inflammatory process: Which variables? When assess? *Eur J Surg Suppl* 584: 70-2
95. Walsh DS, Siritongtaworn P, Pattanapanyasat K, Thavichaigarn P, Kongcharoen P, Jiarakul N, Tongtawe P, Yongvanitchit K, Komoltri C, Dheeradhada C, Pearce FC, Wiesmann WP, Webster HK (2000): Lymphocyte activation after non thermal trauma. *Br J Surg* 87: 223-30
96. Waltier DC, Laffey JG, Boylan JF, Cheng DC (2002): The systemic inflammatory responses to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 97: 215-52
97. Weiss A (2003): T-lymphocyte activation. In: Paul WE (Hrsg.) *Fundamental Immunologie*, 5<sup>th</sup> Ed., Raven Press, New York, Chapter 11
98. Werneman J, Hammarqvist F (1999): Glutamine: a necessary nutrient for the intensive care patient. *Int J Colorectal Dis* 14: 137-42
99. Wilmore DW (2001): The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J Nutr* 131: 2543-49

100. Wischmeyer PE, Lynch J, Liedel J, Wolfson R, Riehm J, Gottlieb L, Kahana M (2001): Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: A prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit Care Med* 29: 2075-80
101. Yao G-X, Xue X-B, Jiang Z-M, Yang N-F, Wilmore D W (2005): Effects of glutamine-dipeptide supplementation on plasma endotoxine level, plasma endotoxine inactivation capacity and clinical outcome. *Clin Nutr* 24: 510-5
102. Yaqoob P, Calder PC (1998): Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: different sensitivity to glutamine availability. *Cytokine* Vol 10 No10: 790-4
103. Yoshida S, Matsui M, Shirouzu Y, Fujita H, Yamana H, Shirouzu K (1998): Effect of glutamine supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut barrier function in patients with advanced esophageal cancer. *Ann Surg* 227: 485- 492
104. Young VR, Ajami AM (2001): Glutamine: The emperor or his clothes? *J Nutr* 131: 2449S- 59S
105. Zheng Y-M, Li F, Zhang M-M, Wu X-T, (2006): Gutamine dipeptide for parenteral nutrition in abdominal surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol* 12 (46): 7537- 41

## 6. Anhang

### 6.1 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Detektion intrazellulärer Zytokine

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der intrazellulären Detektion der Zytokine dargestellt. Auf die Auflistung der Gesamtergebnisse der einzelnen Zytokine erfolgt die unterteilte Darstellung der jeweiligen Terzile. Für die Tabellen 16- 24 gelten folgende Symbole:

\*  $\leq 0,05$  im Gruppenvergleich

#  $\leq 0,05$  im Vergleich zum präoperativen Ausgang

**Tabelle 16: Tabellarische Darstellung der IL-2 produzierenden T-Lymphozyten in Prozent (Mittelwert und Standardabweichung)**

PoT = postoperativer Tag

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n	p-Wert
<b>Präoperativ</b>	44,3 ± 18,2	22	44,8 ± 15,0	21	45,4 ± 17,9	20	p = 0,977
<b>Postoperativ</b>	52,6 ± 15,7	22	44,1 ± 15,7	21	45,6 ± 21,1	20	p = 0,252
<b>PoT 1</b>	38,5 ± 17,2	22	35,1 ± 13,8	20	33,9 ± 12,1	16	p = 0,595
<b>PoT 2</b>	36,2 ± 14,3	21	36,4 ± 13,0	21	38,0 ± 12,4	17	p = 0,908
<b>PoT 3</b>	41,0 ± 14,2	19	39,8 ± 14,7	18	39,9 ± 14,8	16	p = 0,964

**Tabelle 17: Tabellarische Darstellung der Terzile der IL-2 produzierenden T-Lymphozyten in Prozent (Mittelwert und Standardabweichung)**

<i>Erste Terzile</i>						
	<b>Glutamin</b>	<b>n</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>n</b>	<b>NaCl</b>	<b>n</b>
<b>Präoperativ</b>	23,3 ± 10,3	7	27,7 ± 9,8	7	22,5 ± 8,4	6
<b>Postoperativ</b>	40,3 ± 16,6	7	33,2 ± 16,7	7	29,3 ± 20,2	6
<b>PoT 1</b>	34,5 ± 8,0 *	6	23,2 ± 3,9	7	23,2 ± 7,8	4
<b>PoT 2</b>	31,6 ± 12,5	6	28,7 ± 9,9	7	32,8 ± 9,9	5
<b>PoT 3</b>	30,3 ± 14,3	6	31,6 ± 14,8	7	34,6 ± 16,8	5
<i>Zweite Terzile</i>						
	<b>Glutamin</b>	<b>n</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>n</b>	<b>NaCl</b>	<b>n</b>
<b>Präoperativ</b>	47,1 ± 6,0	7	47,3 ± 5,3	7	49,7 ± 5,6	7
<b>Postoperativ</b>	56,7 ± 13,8	7	46,3 ± 11,7	7	53,3 ± 15,0	7
<b>PoT 1</b>	40,6 ± 18,1	7	41,9 ± 12,0	6	39,3 ± 8,8	7
<b>PoT 2</b>	37,7 ± 16,6	7	38,0 ± 14,9	7	40,2 ± 14,8	7
<b>PoT 3</b>	45,8 ± 12,1	6	42,4 ± 14,8	5	40,7 ± 15,1	7
<i>Dritte Terzile</i>						
	<b>Glutamin</b>	<b>n</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>n</b>	<b>NaCl</b>	<b>n</b>
<b>Präoperativ</b>	63,9 ± 4,9	7	59,2 ± 5,5	7	64,3 ± 4,7	6
<b>Postoperativ</b>	62,1 ± 8,9	7	53,0 ± 13,0	7	53,8 ± 22,8	6
<b>PoT 1</b>	47,5 ± 17,4 #	6	41,3 ± 14,6 #	7	39,5 ± 12,3 #	4
<b>PoT 2</b>	41,4 ± 15,7 #	6	42,6 ± 11,3 #	7	40,2 ± 13,6 #	4
<b>PoT 3</b>	50,0 ± 7,1 #	6	47,4 ± 11,1 #	6	45,3 ± 13,2 #	4

**Tabelle 18: Tabellarische Darstellung der IL-1 produzierenden T-Lymphozyten in Prozent (Mittelwert und Standardabweichung)**

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n	p-Wert
<b>Präoperativ</b>	7,5 ± 3,6	22	7,3 ± 4,3	21	7,4 ± 3,7	20	p = 0,984
<b>Postoperativ</b>	7,4 ± 3,1	22	7,6 ± 2,7	21	7,6 ± 2,2	20	p = 0,949
<b>PoT 1</b>	7,8 ± 3,0	22	7,9 ± 3,0	20	7,9 ± 4,2	17	p = 0,996
<b>PoT 2</b>	7,1 ± 2,1	21	7,1 ± 2,5	21	7,1 ± 2,4	18	p = 0,999
<b>PoT 3</b>	6,7 ± 2,3	19	6,8 ± 2,3	19	7,0 ± 2,0	16	p = 0,937

**Tabelle 19: Tabellarische Darstellung der Terzile der IL-1 produzierenden T-Zellen in Prozent (Mittelwert und Standardabweichung)**

<i>Erste Terzile</i>						
	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n
<b>Präoperativ</b>	4,1 ± 1,5	8	3,9 ± 0,8	7	4,0 ± 1,2	7
<b>Postoperativ</b>	5,5 ± 2,2	8	5,7 ± 2,3	7	5,6 ± 1,7	7
<b>PoT 1</b>	5,4 ± 1,2	7	5,4 ± 2,2	7	5,4 ± 2,3	6
<b>PoT 2</b>	5,6 ± 1,2 #	8	5,4 ± 1,1 #	7	5,7 ± 0,7 #	4
<b>PoT 3</b>	5,0 ± 1,2	6	5,2 ± 1,8	7	5,1 ± 1,4	5
<i>Zweite Terzile</i>						
	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n
<b>Präoperativ</b>	6,9 ± 1,0	7	6,5 ± 1,3	7	6,6 ± 0,7	7
<b>Postoperativ</b>	7,2 ± 3,3	7	7,1 ± 1,6	7	7,3 ± 1,1	7
<b>PoT 1</b>	8,2 ± 2,9	7	7,9 ± 2,3	7	8,4 ± 5,3	5
<b>PoT 2</b>	6,7 ± 1,8	7	6,5 ± 2,3	7	6,6 ± 2,8	7
<b>PoT 3</b>	7,2 ± 1,4	7	7,1 ± 2,6	7	6,9 ± 1,4	5
<i>Dritte Terzile</i>						
	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n
<b>Präoperativ</b>	12,1 ± 0,8	7	12,5 ± 2,5	7	12,2 ± 2,3	6
<b>Postoperativ</b>	9,7 ± 2,5	7	9,8 ± 2,4	7	10,0 ± 1,3	6
<b>PoT 1</b>	10,6 ± 3,0	6	10,9 ± 1,8	6	9,9 ± 4,1	6
<b>PoT 2</b>	9,7 ± 1,1 #	5	9,4 ± 2,1 #	7	9,0 ± 1,8 #	6
<b>PoT 3</b>	8,8 ± 2,2 #	5	8,6 ± 1,0 #	5	8,7 ± 1,3 #	6

**Tabelle 20: Tabellarische Darstellung der IL-8 produzierenden T-Lymphozyten in Prozent (Mittelwert und Standardabweichung)**

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n	p-Wert
<b>Präoperativ</b>	4,8 ± 2,3	22	4,7 ± 2,5	21	4,7 ± 2,3	16	p = 0,986
<b>Postoperativ</b>	6,0 ± 2,8	23	5,9 ± 2,6	21	5,9 ± 2,4	16	p = 0,996
<b>PoT 1</b>	5,7 ± 2,4	23	5,6 ± 2,1	20	5,6 ± 2,0	13	p = 0,962
<b>PoT 2</b>	4,9 ± 2,4	20	4,7 ± 2,2	21	4,9 ± 2,2	13	p = 0,954
<b>PoT 3</b>	4,8 ± 2,2	19	4,9 ± 2,3	18	4,7 ± 2,2	12	p = 0,966

**Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der Terzile der IL-8 produzierenden T-Zellen in Prozent (Mittelwert und Standardabweichung)**

<i>Erste Terzile</i>						
	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n
<b>Präoperativ</b>	2,3 ± 0,6	8	2,3 ± 0,5	7	2,5 ± 0,4	6
<b>Postoperativ</b>	4,1 ± 1,2 #	8	4,0 ± 1,5 #	7	4,1 ± 1,0 #	6
<b>PoT 1</b>	3,9 ± 0,8 #	7	4,0 ± 1,7 #	6	3,8 ± 0,4 #	5
<b>PoT 2</b>	3,3 ± 1,4	6	3,3 ± 1,6	7	3,4 ± 1,2	5
<b>PoT 3</b>	2,6 ± 0,6	5	2,4 ± 0,7	5	2,5 ± 0,5	4
<i>Zweite Terzile</i>						
	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n
<b>Präoperativ</b>	4,4 ± 0,9	8	4,2 ± 0,7	7	4,4 ± 0,9	5
<b>Postoperativ</b>	5,3 ± 2,6	8	5,1 ± 1,1	7	5,1 ± 1,6	5
<b>PoT 1</b>	5,0 ± 1,9	8	4,8 ± 1,3	7	5,1 ± 1,6	3
<b>PoT 2</b>	3,7 ± 1,3	7	3,9 ± 1,1	7	3,9 ± 0,5	3
<b>PoT 3</b>	4,2 ± 1,6	7	4,2 ± 0,5	6	4,1 ± 1,6	3
<i>Dritte Terzile</i>						
	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n
<b>Präoperativ</b>	7,6 ± 0,9	7	7,6 ± 1,5	7	7,6 ± 0,9	5
<b>Postoperativ</b>	8,9 ± 2,1	7	8,5 ± 2,4	7	8,8 ± 1,5	5
<b>PoT 1</b>	7,6 ± 1,2	7	7,7 ± 1,7	7	7,6 ± 1,1	5
<b>PoT 2</b>	7,4 ± 1,4	6	7,0 ± 1,8	7	7,1 ± 1,9	5
<b>PoT 3</b>	6,9 ± 1,5	7	7,3 ± 1,3	7	6,8 ± 1,3	5

**Tabelle 22: Tabellarische Darstellung der IL-10 produzierenden T-Zellen in Prozent (Mittelwert und Standardabweichung)**

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n	p-Wert
<b>Präoperativ</b>	5,1 ± 2,4	22	5,0 ± 2,3	22	5,0 ± 2,5	20	p = 0,980
<b>Postoperativ</b>	4,6 ± 1,5	23	4,6 ± 1,7	21	4,7 ± 1,7	20	p = 0,963
<b>PoT 1</b>	5,8 ± 2,1	23	5,8 ± 2,0	20	5,7 ± 2,3	17	p = 0,995
<b>PoT 2</b>	5,1 ± 2,2	21	5,0 ± 2,5	21	5,0 ± 2,0	17	p = 0,993
<b>PoT 3</b>	5,3 ± 2,4	19	5,1 ± 2,5	17	4,8 ± 2,0	15	p = 0,845

**Tabelle 23: Tabellarische Darstellung der Terzile der IL-10 produzierenden T-Zellen in Prozent (Mittelwert und Standardabweichung)**

*Erste Terzile*

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n
<b>Präoperativ</b>	2,5 ± 0,6	8	2,5 ± 0,5	8	2,5 ± 0,5	7
<b>Postoperativ</b>	3,2 ± 0,5 #	8	3,3 ± 1,3	8	3,2 ± 1,4	7
<b>PoT 1</b>	3,7 ± 1,0 #	8	3,8 ± 0,8 #	8	3,9 ± 0,9 #	7
<b>PoT 2</b>	3,3 ± 0,6 #	7	3,0 ± 1,5	8	3,1 ± 0,9	7
<b>PoT 3</b>	2,9 ± 0,7	6	3,1 ± 1,4	7	3,0 ± 1,0	6

*Zweite Terzile*

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n
<b>Präoperativ</b>	5,2 ± 1,4	7	5,1 ± 0,6	7	4,9 ± 0,9	7
<b>Postoperativ</b>	4,5 ± 0,6	7	4,5 ± 1,5	7	4,7 ± 1,2	7
<b>PoT 1</b>	5,6 ± 1,0	6	5,5 ± 1,3	5	5,6 ± 2,1	4
<b>PoT 2</b>	4,9 ± 1,9	7	5,0 ± 1,3	6	5,1 ± 0,6	4
<b>PoT 3</b>	4,7 ± 1,0	5	4,9 ± 0,8	3	4,9 ± 1,2	4

*Dritte Terzile*

	Glutamin	n	Aminosäuren	n	NaCl	n
<b>Präoperativ</b>	7,9 ± 0,6	7	7,7 ± 0,8	7	7,9 ± 1,8	6
<b>Postoperativ</b>	6,4 ± 1,3 #	7	5,9 ± 1,2 #	7	5,7 ± 1,1 #	6
<b>PoT 1</b>	7,7 ± 1,0	7	7,8 ± 1,3	7	7,9 ± 1,7	6
<b>PoT 2</b>	7,1 ± 2,3	6	7,0 ± 2,5	7	6,9 ± 0,7	6
<b>PoT 3</b>	7,3 ± 1,8	7	7,2 ± 2,0	7	7,0 ± 0,8	5

**Tabelle 24: Tabellarische Darstellung des Plasma-Glutamin-Spiegels ( $\mu\text{M}$ ) (Mittelwert und Standardabweichung)**

	<b>Glutamin</b>	<b>n</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>n</b>	<b>NaCl</b>	<b>n</b>	<b>p-Wert</b>
<b><i>Präoperativ</i></b>	604,9 $\pm$ 144,2	23	578,8 $\pm$ 150,9	20	601,3 $\pm$ 83,4	20	p=0,784
<b><i>Postoperativ</i></b>	1177,3 $\pm$ 351,9	23	534,8 $\pm$ 159,8	20	610,0 $\pm$ 138,3	20	P<0,01
<b><i>PoT 1</i></b>	958,0 $\pm$ 331,4	23	526,8 $\pm$ 104,7	20	488,7 $\pm$ 104,0	20	p<0,01
<b><i>PoT 2</i></b>	753,1 $\pm$ 342,2	23	492,9 $\pm$ 93,1	20	455,1 $\pm$ 75,9	20	P<0,01
<b><i>PoT 3</i></b>	524,9 $\pm$ 83,2	23	470,6 $\pm$ 83,2	20	480,1 $\pm$ 46,5	20	p=0,04



## 6.2 Patientendaten

In der folgenden Tabelle sind die Daten der Patienten in der Reihenfolge ihrer Teilnahme an dieser Studie aufgelistet.

**Tabelle 25: Darstellung der Daten der an der Studie teilgenommenen Patienten**

Nummer	Geb.	Alter	Größe	Gewicht	ASA
1	12.06.1930	72	163	86	3
2	24.05.1932	70	165	88	3
3	15.08.1935	67	172	64	4
4	26.12.1929	73	170	72	3
5	08.05.1934	68	164	77	3
6	31.12.1921	82	154	58	3
7	08.01.1939	64	165	58	3
8	28.05.1932	70	171	77	3
9	06.08.1932	70	170	74	3
10	10.06.1950	52	168	120	3
11	13.10.1933	70	183	87	3
12	17.01.1930	73	150	55	3
13	21.07.1919	83	168	55	4
14	09.02.1933	70	178	72	3
15	16.01.1928	75	176	87	3
16	28.06.1932	70	168	65	3
17	10.11.1954	48	187	97	3
18	26.12.1926	76	168	62	3
19	31.05.1931	71	185	85	3
20	25.02.1941	62	160	66	3
21	10.08.1925	77	164	69	3
22	31.08.1929	73	164	72	3
23	08.12.1921	81	166	95	3
24	12.03.1921	82	158	63	3
25	05.07.1930	72	163	90	3
26	09.05.1934	69	160	74	3
27	22.01.1935	68	180	90	3
28	20.12.1926	76	170	71	3
29	25.12.1935	67	172	73	3
30	25.02.1964	39	172	85	3
31	18.01.1931	72	169	71	3
32	23.12.1923	79	163	78	3
33	19.12.1934	68	174	90	3
34	22.02.1940	63	174	86	3
35	14.06.1927	76	168	82	3
36	13.11.1923	79	168	81	3
37	11.12.1924	78	172	78	4

38	01.06.1926	77	170	68	3
39	21.08.1938	64	168	78	3
40	15.06.1940	63	184	110	3
41	28.12.1928	74	170	80	3
42	26.11.1934	68	173	76	3
43	14.11.1927	75	163	64	3
44	26.09.1935	67	1,55	48,1	3
45	09.04.1926	77	1,62	65	3
46	17.12.1935	67	1,74	85	3
47	22.11.1949	53	1,75	88	3
48	27.11.1926	76	1,68	75	3
49	09.09.1939	63	1,68	62	3
50	12.10.1931	71	1,65	75,7	3
51	17.11.1928	74	1,52	67,6	3
52	26.11.1941	61	1,68	81,9	3
53	08.04.1923	80	1,56	73	3
54	09.01.1931	72	1,65	70	3
55	21.05.1928	75	1,88	76	3
56	06.10.1933	69	1,76	74	3
57	06.05.1940	63	1,82	76	3
58	26.04.1935	68	1,7	77	3
59	02.02.1931	72	1,81	91	3
60	30.10.1940	62	1,75	71	3
61	24.05.1934	69	1,72	95	3
62	08.11.1933	69	1,58	54,8	3
63	23.04.1937	66	1,78	85	3
64	29.03.1924	79	1,78	85,3	3
65	02.09.1927	65	1,62	73,1	3
66	18.07.1948	55	1,7	90	3
67	14.07.1945	58	1,75	73	3
68	11.06.1924	79	1,65	58	3
69	25.08.1929	74	1,59	63	3
70	24.11.1920	83	1,62	74	3
71	06.01.1941	62	1,7	70,4	3
72	16.03.1929	74	1,65	70,1	3
73	31.08.1927	76	1,58	58,5	3
74	25.05.1934	69	1,68	73	3
75	28.10.1943	60	1,84	84,5	3
76	21.05.1938	65	1,75	85	3
77	29.10.1944	59	1,76	87	3
78	26.12.1936	67	1,82	98	3
79	04.11.1940	63	1,65	70,7	3

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

ACB	Aortokoronarer Bypass
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Ala-Gln	L-Alanin-L-Glutamin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BD	Becton & Dickinson
BFA	Brefeldin A
CI	Cardiac Index
ConA	Concanavalin A
CPB	Kardiopulmonaler Bypass Cardiopulmonary Bypass
CRP	C-Reaktives Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTH	Delayed-Type Hypersensitivity
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme Linked Immunoassay
EN	Enterale Ernährung Enteral Nutrition
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
F-HPLC	Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
FSC	Forward Scatter
Gly-Gln	L-Glycin-L-Glutamin

HLM	Herz-Lungen-Maschine
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
M	Molare Konzentration
μ	Mikro
MHC	Major-Histokompatibilitäts-Komplex
MKE	Mitralklappenersatz
MOF	Multi-Organ-Versagen (Multi Organ Failure)
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate buffered Saline
PE	Phycoerythrocine
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PHA	Phytohaemagglutinin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PoT	Postoperativer Tag
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
SIRS	Systemisches inflammatorisches Antwortsyndrom Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SSC	Side Scatter

TH	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPN	Totale parenterale Ernährung
TZR	T-Zell-Rezeptor

#### **6.4    Verwendete Materialien**

Aqua dest.  
Fa. Baxter Deutschland GmbH  
Bestellnr.: 001428

Brefeldin A (BFA), 5mg  
Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
Katalognr.: B-7651

Brutschrank BB 16  
Heraeus Instruments, Hanau  
Bestellnr.: 51010689

Dimethyl sulfoxide (DMSO) 500ml  
Fa.: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
Katalognr.: D-8779

Druchflusszytometer FACSCalibur  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg

Ethanol (EtOH)  
Fa. Riedel-de Haën AG, Seelze  
Bestellnr.: 32205

FACSClean  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg  
Katalognr.: 340345

FACSFlow  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg  
Katalognr.: 342003

FACS-Lysing-Solution, 100ml, 10fach konzentriert  
BD PharMingen, BD Biosciences, Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg  
Katalognr.: 349202

FACS-Permeabilizing-Solution 2, 10fach konzentriert  
BD PharMingen, BD Biosciences, Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg  
Katalognr.: 340973

FACSRinse  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg  
Katalognr.: 340346

Falcon Polystyrol-Röhrchen mit Deckel, 5ml, 12 x 75mm  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg  
Bestellnr.: 352054

Falcon Polypropylen-Röhrchen, 50ml  
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg  
Bestellnr.: 352070

FastImmune $\gamma$ 2aFITC/ $\gamma$ 1PE Isotypekontrolle	Katalognr.: 340458
CD3 FITC	Katalognr.: 345763
CD3 PE	Katalognr.: 345765
CD3 PerCP	Katalognr.: 345766
CD69 PE	Katalognr.: 341652
IL-1 $\alpha$ PE	Katalognr.: 554561
IL-2 PE	Katalognr.: 559334
IL-8 PE	Katalognr.: 559336
IL-10 PE	Katalognr.: 559337
BD PharMingen, BD Biosciences, Fa. Necton & Dickinson, Heidelberg	

Ionomycin, 1mg  
Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
Katalognr.: I-0634

Laborzentrifuge Universal/K2S  
Werknr.: 39366  
Hettich Zentrifugen Tuttlingen

Phosohate Pufferd Saline (PBS), 500ml  
Fa. BAG Lich  
Bestellnr.: 3613

Phorbol 12-Mystrate 13-Acetate (PMA), 5mg  
Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
Katalognr.: P-8139

PrimavetteS mit Natrium-Heparinat Gel, 7,5ml  
KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth  
Bestellnr.: 09592700

Reagenzröhrchen, 1,5ml, 39x10,8mm  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht  
Bestellnr.: 72.690

Reagenzröhrchen, 10ml  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht  
Bestellnr.: 55.468

RPMI-1640 Medium, 100ml  
Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen  
Bestellnr.: R-0883  
Spitzen für Pipette, 0,5-10 $\mu$ l

Bestellnr.: 70.1115  
Spitzen für Pipette, 10-100µl  
Bestellnr.: 70.760.002  
Spitzen für Pipette, 100-1000µl  
Bestellnr.: 70.762  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht

Stoppuhr  
Eurochron. GmbH, Seebach/Thüringen  
Modellnr.: 336/0001

Variable Mikroliterpipette, 0,5-10µl  
Bestellnr.: 4910 000.018  
Variable Mikroliterpipette, 10-100µl  
Bestellnr.: 4910 000.042  
Variable Mikroliterpipette, 100-1000µl  
Bestellnr.: 4910 000.069  
Fa. Eppendorf, Hamburg

Vortexer REAX 2000  
Heidolph Instruments, Schwabach  
Bestellnr.: 541.19000.00

## 7. Lebenslauf

<b>Name</b>	Sebastian Ruhs
<b>geboren</b>	16.März 1979 in Nürnberg
<b>Eltern</b>	Karl-Heinz und Ursula Ruhs
<b>Schul Ausbildung</b>	
1985 - 1989	Grundschule Usingen
1989 - 1991	Ludwig-Uhland-Schule Giessen, Förderstufe
1991 - 1998	Liebigsschule Giessen, Gymnasialzweig
Juni 1998	Schulabschluss mit dem Abitur
<b>Berufliche Ausbildung</b>	
Aug. 1998- März 1999	Praktikum bei der `Sparkasse Giessen`
April 1999- Dez. 1999	Ausbildung zum Krankenpfleger am Klinikum der `Justus-Liebig-Universität` Giessen
Jan. 2000- Nov. 2000	Zivildienst im Rettungsdienst mit Prüfung zum Rettungssanitäter
Dez. 2000- Aug 2006	Nebentätigkeit im Rettungsdienst bei `Die Johanniter` als Rettungssanitäter
Okt. 2000- Juni 2007	Studium der Humanmedizin an der `Justus-Liebig-Universität` Giessen und `Universität zu Köln`



## **8. Danksagung**

Besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. J.M. Engel für die sehr gute Betreuung, die vielen Anregungen, das große Verständnis und seine bemerkenswerte Geduld bedanken. Seiner besonderen Unterstützung verdanke ich diese Dissertation.

Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. G. Hempelmann für die Möglichkeit und die Unterstützung bei der Forschung in seiner Abteilung bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau B. Weber und ihrer Abteilung für die Unterstützung bei labortechnischen und analytischen Problemen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, für ihre Hilfe, die Unterstützung und den familiären Rückhalt. Dadurch haben Sie einen maßgeblichen Anteil daran, dass ich das Studium und diese Arbeit leisten konnte. Meine Dankbarkeit dafür möchte ich hiermit noch mal besonders zum Ausdruck bringen.